

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO



FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“VALIDACIÓN DEL MÉTODO CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLES PARA
DETERMINAR DIGESTIBILIDAD EN ALIMENTO BALANCEADO
FRENTE AL MÉTODO DE RECOLECCIÓN TOTAL.”

TESIS DE GRADO

Previa la obtención del Título de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Presentado por:

JESSENIA KATHERINE BUÑAY ASTUDILLO

Riobamba – Ecuador

2010

DEDICATORIA

Este trabajo dedico con mucho cariño a mi madre y a mi padre por enseñarme que el trabajo dignifica, que la educación libera y que la unión de las dos hace la grandeza de las almas libres.

A mis hermanas por su cariño e invaluable apoyo, especialmente a Karina quien con su ejemplo me inspiró a no detenerme ante la adversidad.

A todas esas personas maravillosas que confiaron en mí, y me supieron dar su amistad incondicional.

AGRADECIMIENTO

A mi Padre Celestial por todas las bendiciones que me ha regalado y permitirme avanzar con éxito una etapa más de mi vida.

Un inmenso agradecimiento a mis padres por su gran amor y dedicación constante en mi formación, ya que sin ellos no estuviera hoy aquí, a mis hermanas y a mis queridos amigos por sus nobles consejos y el cariño que me han brindado.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, a mis maestros y tutores, quienes con sus sabios conocimientos me han permitido edificarme hacia un ser emprendedor.

A la Procesadora Nacional de Alimentos C.A – PRONACA Quevedo, Departamento de Aseguramiento de Calidad, y al Departamento de Investigación y Nutrición, por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad de desarrollarme como profesional.

A la Dra. Olga Lucero asesora en la dirección de la presente Tesis por sus enseñanzas, su paciencia y sobre todo por su valiosa amistad, de igual manera a los Miembros del Tribunal de Tesis por el gran aporte brindado en la elaboración del trabajo.

Al Ing. Marcelo Mosquera por su asistencia técnica y apoyo decidido durante el desarrollo de esta investigación, a la Dra. Katerine Lara y mis compañeros de PRONACA Quevedo, que me supieron guiar y colaborar.

A mis amigos que siempre estuvieron ahí para apoyarme: Paola, Paty, Tania, José Luís, Javier, Edwin, Germán, de manera especial a Fernando que supo ser mi fortaleza en momentos de debilidad, y a todos esos seres que se sacrificaron por mí.

Mil gracias.....!

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: **“VALIDACIÓN DEL MÉTODO CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLES PARA DETERMINAR DIGESTIBILIDAD EN ALIMENTO BALANCEADO FRENTE AL MÉTODO DE RECOLECCIÓN TOTAL.”**, de responsabilidad de la señorita egresada Jessenia Katherine Buñay Astudillo, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE	FIRMA	FECHA
Dr. Yolanda Díaz DECANA FACULTAD DE CIENCIAS
Dra. Olga Lucero DIRECTORA DE TESIS
Dr. Galo Insuasti MIEMBRO DEL TRIBUNAL
Tglo. Carlos Rodríguez DIRECTOR DEL CENTRO DE DOCUMENTACIÓN

Yo, Jessenia Katherine Buñay Astudillo, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y a la Procesadora Nacional de Alimentos C.A.- PRONACA.

JESSENIA KATHERINE BUÑAY ASTUDILLO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C	=	Grados Celsius
Alt	=	Alternativa de análisis
AOAC	=	Asociación Oficial de Químicos Analistas
BPL	=	Buenas Prácticas de Laboratorio
BPM	=	Buenas Prácticas de Manufactura
CD	=	Coefficiente de Digestibilidad
CIA	=	Método de Cenizas Ácido Insolubles
cm	=	Centímetros
CTH	=	Colección Total de Heces
cv	=	Coefficiente de variación
EB	=	Energía Bruta
ECU	=	Ecuador
ELN	=	Extracto Libre de Nitrógeno
FAO	=	Organización para la Alimentación y la Agricultura
g	=	Gramos
h	=	Horas
IAEA	=	Agencia Internacional de Energía Atómica
ICH	=	Conferencia Internacional de Armonización
IEC	=	Comisión Internacional de Electrotécnica
INEN	=	Instituto Nacional Estandarización y Normalización
ISO	=	Organización Internacional para la Estandarización
IUPAC	=	Unión Internacional de química pura y aplicada
<i>k</i>	=	Factor de Cobertura
Kcal	=	Kilocalorias
Kg	=	Kilogramos
L	=	Litros
LD	=	Limite de Detección
MA	=	Marcador en el Alimento
min	=	Minutos
mg	=	Miligramos

MH	=	Marcador en heces
mL	=	Militros
N	=	Normalidad
NA	=	Nutrientes en el Alimento
NA-AC-M	=	Nutrición Animal- Aseguramiento de Calidad- Método
NH	=	Nutriente en heces
OAA	=	Organismo Argentino de Acreditación
OMS	=	Organización Mundial de la Salud
ppm	=	Partes por millón
PRONACA	=	Procesadora Nacional de Alimentos C.A.
RT		Método de Recolección Total
sR		Desviación estándar de Reproducibilidad
T322R1BA		T: producto terminado
	=	322: alimento para cerdos
		R1: relacionado
		BA: ensacado
U		Incertidumbre

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	i
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	
ix	
ÍNDICE DE FIGURAS.....	
xi	
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍA.....	
xii	
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	
xiii	
1. PARTE TEÓRICA.....	1
1.1 VALIDACIÓN.....	1
1.1.1 Validación de Métodos de Análisis.....	4
1.1.2 Guía para Validación de Métodos de Ensayo.....	5
1.1.3 Determinaciones de Parámetros Estadísticos y Realización de las medidas de validación.....	11
1.1.4 Reglamento de Validación.....	19
1.1.5 Protocolos, Estándares y Guías Existentes.....	20
1.2 DIGESTIBILIDAD.....	21
1.2.1 Determinación de la Digestibilidad de los Alimentos.....	24
1.2.2 Generalidades sobre el Uso de Marcadores para ensayo de Digestibilidad.....	25
1.3 ENERGÍA BRUTA.....	28
1.3.1 Energía Digestible.....	30
1.3.2 Energía Metabolizable.....	31
1.3.3 Energía Neta.....	31
1.3.3.1 Energía de Mantenimiento.....	32
1.3.3.2 Energía de Ganancia de Peso.....	32
1.4 MÉTODO CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLE.....	32
1.4.1. Determinación de las cenizas insolubles en ácido.....	35
1.5 MÉTODO DE RECOLECCIÓN TOTAL.....	36
1.6 ALIMENTOS.....	37
1.6.1 Muestreo.....	39

1.6.1.1	Preparación de la Muestra.....	40
1.6.2.	Análisis Proximal.....	42
1.6.2.1	Humedad.....	42
1.6.2.2	Proteínas y su necesidad.....	43
1.6.2.3	Grasa.....	43
1.6.2.4	Fibra Cruda.....	45
1.6.2.5.	Cenizas Totales.....	46
2	PARTE EXPERIMENTAL	48
2.1	LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN.....	48
2.1.1	Ubicación.....	48
2.2	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.....	49
2.2.1	Material Biológico.....	49
2.2.2	Materia Prima.....	49
2.2.3	Materiales.....	49
2.2.4	Equipos y Accesorios.....	50
2.2.5	Reactivos.....	51
2.3	MÉTODOS.....	51
2.4	UNIDAD EXPERIMENTAL.....	51
2.5	MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO.....	52
2.5.1	Metodología de preparación del material biológico.....	54
2.5.2	Preparación de muestras de alimento balanceado.....	55
2.5.3	Preparación de muestras de heces.....	55
2.5.4	Alternativas para determinar Cenizas Ácido Insolubles.....	58
2.5.5	Determinación de digestibilidad por el método cenizas ácido insolubles.....	62
2.5.6	Determinación de digestibilidad por el método de recolección total.	63
2.6	MÉTODOS DE ANÁLISIS EN EL LABORATORIO.....	63
2.6.1	Determinación de Humedad por perdida de secado.....	63
2.6.2	Determinación de Energía Bruta.....	65
3	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	69
4	CONCLUSIONES	97
5	RECOMENDACIONES	100
6	RESUMEN	101
7	BIBLIOGRAFÍA	103

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 1	Objetivos de la validación según el tipo de procedimiento de ensayo.....	8
TABLA N° 2	Alcance de la validación según el tipo de procedimiento de prueba.....	8
TABLA N° 3	Modificaciones al método de ensayo sobre los parámetros a determinar	9
TABLA N° 4	Parámetros de validación con la tolerancia en sus resultados.....	12
TABLA N° 5	Lugar de realización y aplicación del trabajo de investigación.....	48
TABLA N° 6	Condiciones de análisis de la Alternativa 1 del Método de Cenizas Ácido Insolubles.....	52
TABLA N° 7	Condiciones de análisis de la Alternativa 2 del Método de Cenizas Ácido Insolubles.....	53
TABLA N° 8	Condiciones de análisis de la Alternativa 3 del Método de Cenizas Ácido Insolubles.....	53
TABLA N° 9	Condiciones de análisis del Método de Recolección Total de heces.....	54
TABLA N° 10	Análisis de varianza del Coeficiente de Digestibilidad de las tres Alternativas del método CIA y del método Recolección Total de heces.	69

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N° 1	Prueba de tukey al 5% para la comparación entre el método de recolección total y las diferentes alternativas del método ceniza ácido insoluble para determinar digestibilidad en alimento balanceado. Departamento de Investigación y Aseguramiento de Calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Febrero del 2010.....	69
CUADRO N° 2	Porcentaje de humedad en alimento balanceado cerdos desarrollo 2. Departamento de Investigación y Aseguramiento de Calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Febrero del 2010.....	70
CUADRO N° 3	Porcentaje de humedad en heces de cerdos cuando ingirieron alimento balanceado cerdos desarrollo 2. Departamento de Investigación y Aseguramiento de Calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Febrero del 2010.....	72
CUADRO N° 4	Energía bruta en alimento balanceado cerdos desarrollo 2. Departamento de Investigación y Aseguramiento de Calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Febrero del 2010.....	73
CUADRO N° 5	Energía bruta en heces de cerdos cuando se les administro alimento balanceado cerdos desarrollo 2. Departamento de Investigación y Aseguramiento de Calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Febrero del 2010.....	75
CUADRO N° 6	Coefficiente de digestibilidad mediante el método de recolección total en alimento balanceado cerdos desarrollo 2. Durante cinco días de recolección en cuatro animales de experimentación. Departamento de Investigación y Aseguramiento de Calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Marzo del 2010.....	76
CUADRO N° 7	Coefficiente de digestibilidad mediante el método cenizas ácido insolubles alternativa 1 (Shrivastava and Talapatra -1962) en alimento balanceado cerdos desarrollo 2 en cuatro animales de experimentación. Departamento de Investigación y Aseguramiento de Calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Marzo del 2010.....	77
CUADRO N° 8	Coefficiente de digestibilidad mediante el método cenizas ácido insolubles alternativa 2 (Vogtmann-1975) en alimento balanceado	

	cerdos desarrollo 2 en cuatro animales de experimentación. Departamento de Investigación y Aseguramiento de Calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Abril del 2010.....	79
CUADRO N° 9	Coefficiente de digestibilidad mediante el método cenizas ácido insolubles alternativa 3 (J. Van Keulen and Young-1977) en alimento balanceado cerdos desarrollo 2 en cuatro animales de experimentación. Departamento de Investigación y Aseguramiento de Calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Abril del 2010.....	81
CUADRO N° 10	Incertidumbre de los resultados del coeficiente de digestibilidad (%), comparando el método de recolección total con el método de cenizas ácido insolubles alternativa 1 (Shrivastava and Talapatra -1962). Departamento de Investigación y Aseguramiento de Calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Abril del 2010.....	83
CUADRO N° 11	Incertidumbre de los resultados del coeficiente de digestibilidad (%), comparando el método de recolección total con el método de cenizas ácido insolubles alternativa 2 (Vogtmann-1975). Departamento de Investigación y Aseguramiento de Calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Abril del 2010.....	84
CUADRO N° 12	Incertidumbre de los resultados del coeficiente de digestibilidad (%), comparando el método de recolección total con el método de cenizas ácido insolubles alternativa 3 (J. Van Keulen and Young-1977). Departamento de Investigación y Aseguramiento de Calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Abril del 2010.....	85
CUADRO N° 13	Exactitud obtenida de los resultados de coeficiente de digestibilidad (%), de el método de cenizas ácido insolubles alternativa 1 (Shrivastava and Talapatra -1962) frente al método de recolección. Departamento de investigación y Aseguramiento de Calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Mayo del 2010.....	87
CUADRO N° 14	Exactitud obtenida de los resultados de coeficiente de digestibilidad (%), del método de cenizas ácido insolubles alternativa 2 (Vogtmann-1975) comparando con el método de recolección total. Departamento de Investigación y Aseguramiento de Calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Abril del 2010.....	88
CUADRO N° 15	Exactitud obtenida de los resultados de coeficiente de digestibilidad (%), del método de cenizas ácido insolubles alternativa 3 (J. Van Keulen and Young-1977) comparando con el método de recolección total. Departamento de Investigación y Aseguramiento	

	de Calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Abril del 2010.....	89
CUADRO N° 16	Repetibilidad obtenida de los resultados de coeficiente de digestibilidad (%), del método de cenizas ácido insolubles alternativa 1 (Shrivastava and Talapatra -1962) frente al método de recolección total. Departamento de investigación y aseguramiento de calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Mayo del 2010.....	91
CUADRO N° 17	Repetibilidad obtenida de los resultados de coeficiente de digestibilidad (%), del método de cenizas ácido insolubles alternativa 2 (Vogtmann-1975) comparando con el método de recolección total. Departamento de Investigación y Aseguramiento de Calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Abril del 2010.....	92
CUADRO N° 18	Repetibilidad obtenida de los resultados de coeficiente de digestibilidad (%), del método de cenizas ácido insolubles alternativa 3 (J. Van Keulen and Young-1977) comparando con el método de recolección total. Departamento de Investigación y Aseguramiento de Calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Abril del 2010.....	93
CUADRO N° 19	Limite de detección obtenida de los resultados del porcentaje de cenizas insolubles en ácido aplicado en métodos CIA. Departamento de Investigación y Aseguramiento de Calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Abril del 2010.....	95
CUADRO N° 20	Especificidad obtenida de los resultados del porcentaje de cenizas insolubles en ácido aplicado en métodos CIA. Departamento de Investigación y Aseguramiento de Calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Abril del 2010.....	95

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No. 1	Determinación de energía bruta en alimento balanceado cerdos desarrollo 2 administrado a cuatro animales de experimentación. Departamento de Investigación y Aseguramiento de Calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Febrero del 2010.....	74
GRÁFICO No. 2	Determinación del coeficiente de digestibilidad en porcentaje a través del método de recolección total y el método de cenizas ácido insolubles alternativa 1 (Shrivastava and Talapatra -1962) en alimento balanceado cerdos desarrollo 2 en cuatro animales de experimentación. Departamento de Investigación y Aseguramiento de Calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Marzo 2010.....	78
GRÁFICO No. 3	Determinación del coeficiente de digestibilidad en porcentaje a través del método de recolección total y el método de cenizas ácido insolubles alternativa 1 (Shrivastava y Talapatra -1962) y alternativa 2 (Vogtmann-1975) en alimento balanceado cerdos desarrollo 2 en cuatro animales de experimentación. Departamento de Investigación y Aseguramiento de Calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Abril 2010.....	80
GRÁFICO No. 4	Determinación del coeficiente de digestibilidad en porcentaje a través del método de recolección total y el método de cenizas ácido insolubles alternativa 1 (Shrivastava y Talapatra -1962), alternativa 2 (Vogtmann-1975) y alternativa 3 (J. Van Keulen and Young-1977) en alimento balanceado cerdos desarrollo 2 en cuatro animales de experimentación. Departamento de Investigación y Aseguramiento de Calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Marzo 2010.....	82
GRÁFICO No. 5	Determinación de incertidumbre de los resultados de coeficiente de digestibilidad a través de la comparación del método de recolección total con cada una de las alternativas del método de cenizas ácido insolubles alternativa 1 (Shrivastava y Talapatra -1962), alternativa 2 (Vogtmann-1975) y alternativa 3 (J. Van Keulen and Young-1977). Departamento de Investigación y Aseguramiento de Calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Marzo 2010.....	86

GRÁFICO No. 6	Determinación de exactitud de los resultados de coeficiente de digestibilidad de los métodos ceniza insoluble en ácido (alt1, alt2, alt3) frente al método de referencia (recolección total). Departamento de Investigación y Aseguramiento de Calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Marzo 2010.....	90
GRÁFICO No. 7	Determinación de repetibilidad de los resultados de coeficiente de digestibilidad de los métodos ceniza insoluble en ácido (alt1, alt2, alt3) frente al método de referencia (recolección total). Departamento de Investigación y Aseguramiento de Calidad. Procesadora Nacional de Alimentos CA. PRONACA. Quevedo. Marzo 2010.....	94

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 1	Parámetros de calidad de un método analítico.....	2
FIGURA N° 2	Esquema convencional de partición de energía.....	29
FIGURA N° 3	Esquema de preparación de muestras	58

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍA

FOTOGRAFÍA N° 1	Laboratorio bromatológico.....	4
FOTOGRAFÍA N° 2	Condiciones en laboratorio bromatológico.....	7
FOTOGRAFÍA N° 3	Bomba calorimétrica.....	30
FOTOGRAFÍA N° 4	Cenizas insolubles en ácido.....	33
FOTOGRAFÍA N° 5	Alimento balanceado.....	37
FOTOGRAFÍA N° 6	Toma de muestra de alimento balanceado.....	40
FOTOGRAFÍA N° 7	Preparación de muestras para análisis.....	41
FOTOGRAFÍA N° 8	Equipo de fibra cruda.....	46
FOTOGRAFÍA N° 9	Mufla termo regulable.....	47
FOTOGRAFÍA N° 10	Alojamiento de animales de experimentación. Galpón experimental PRONACA Quevedo.....	55
FOTOGRAFÍA N° 11	Obtención de muestra de heces fecales. Galpón experimental PRONACA Quevedo.....	56
FOTOGRAFÍA N° 12	Balanza semianalítica utilizada para pesar muestras diarias de materia fecal	56
FOTOGRAFÍA N° 13	Determinación de humedad en materia fecal. Laboratorio bromatológico PRONACA Quevedo.....	57
FOTOGRAFÍA N° 14	Pre-incineración de muestras. CIA Alt.1. Laboratorio bromatológico PRONACA Quevedo.....	59
FOTOGRAFÍA N° 15	Tratamiento de muestra directo con ácido. CIA Alt 2. Laboratorio bromatológico PRONACA Quevedo.....	60
FOTOGRAFÍA N° 16	Muestra tratada con ácido clorhídrico 2N. CIA Alt 3. Laboratorio bromatológico PRONACA Quevedo.....	61
FOTOGRAFÍA N° 17	Filtración de cenizas tratadas con ácido. CIA Alt 3. Laboratorio bromatológico PRONACA Quevedo.....	62

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 1	Determinación de humedad en alimento balanceado.....	xvi
ANEXO N° 2	Determinación de humedad en heces de cerdos.....	xvii
ANEXO N° 3	Determinación del coeficiente de digestibilidad a través del método de recolección total de heces.....	xvii
ANEXO N° 4	Ficha técnica de producto terminado cerdos desarrollo 2.....	xviii
ANEXO N° 5	NA-AC15-M01.....	xix
ANEXO N° 6	NA-AC15-M36.....	xx
ANEXO N° 7	NA-AC15-M50.....	xxi

INTRODUCCIÓN

En el análisis de los diferentes parámetros de un laboratorio es imprescindible la utilización de métodos analíticos sometidos a un proceso de validación que permita obtener resultados representativos y fiables, de este modo se puede asegurar la confiabilidad de estos.

Mediante un proceso de validación, ya sea de carácter prospectivo, retrospectivo o de revalidación, se comprueba si el método es lo suficientemente confiable y si los resultados previstos se obtienen dentro de las condiciones prefijadas.

La validación de los métodos analíticos se fundamenta en la determinación de diversos parámetros, que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan. Por este motivo es necesario el uso de la estadística, puesto que la necesidad de soportar el proceso de validación exige el tratamiento estadístico para el manejo y análisis de los datos permitiendo juicios con criterio que llevan a una adecuada evaluación.

El uso de la estadística asociada a un estudio de variabilidad de métodos analíticos, fue reportado en la literatura desde 1946. Posteriormente Youden publicó en 1975 un Manual Estadístico en la Asociación de Químicos Analistas Oficiales (AOAC) en el cual se reportaron las bases de la validación de métodos. (49)

Los objetivos de una validación de métodos incluyen la evaluación de las características de desempeño del método, la demostración que el método desarrollado por un laboratorio es útil para la aplicación propuesta, la demostración que las modificaciones realizadas a un método no afectan su desempeño, obteniendo resultados confiables y la demostrando que un método es equivalente a otro. La validación de métodos de análisis se puede realizar a través de la Comparación con un método oficial, validado o estandarizado, Adición estándar, Comparación de las curvas de regresión lineal de estándares con curvas de regresión lineal de placebos enriquecidos (45)

La digestibilidad es uno de los factores más importantes para evaluar la calidad nutritiva de las raciones que consumen los animales domésticos, porque indica el grado en que los nutrientes de los ingredientes van a ser aprovechados directamente por el animal. Una buena digestibilidad de la dieta resultará en una mayor productividad por parte del animal. (44)

En la determinación de la digestibilidad de alimentos, varias técnicas pueden ser utilizadas, sin embargo la técnica que usa indicadores fue desarrollada debido a las dificultades de realizar la recolección total de las heces excretadas, especialmente en animales de pastoreo. (15)

Los marcadores son compuestos de referencia usados para monitorear aspectos físicos y químicos, haciendo estimaciones cuantitativas o cualitativas de la fisiología nutricional. Los marcadores que se pueden utilizar son cenizas, lignina, y óxido crómico, que son compuestos indigeribles. Estos materiales también han sido denominados como indicadores, trazadores, sustancias de referencia o sustancias indicadoras, y se ha denotado de manera especial, como marcadores de las dietas, a aquellos que pueden ser colocados en ella, pueden ser constituyentes naturales de la misma o ser administrados de forma oral.

Para el cálculo de la digestibilidad con marcadores, según la técnica de las proporciones, se han descrito algunas fórmulas, en función de la relación de las concentraciones de los nutrientes y el marcador, tanto en la ración como en las heces. (44)

La evaluación de diferentes métodos usados en estudios de digestión, surge de la necesidad de simplificar los procedimientos, reducir la labor y costos de las determinaciones. Antes de que una metodología se emplee de forma rutinaria, se debe identificar una o más características deseables del método, dependen de una serie de factores lo que hace necesario algunos experimentos preliminares con el fin de su optimización, para conservar recursos y tiempo.

Las consecuencias de una deficiente calidad en la determinación de parámetros suponen un riesgo para la satisfacción del consumidor debido a un valor incorrecto de los componentes nutricionales por lo que desencadenaría pérdidas económicas.

Para una completa evaluación del valor nutritivo de los alimentos, además de su composición química, los efectos de los procesos de digestión, absorción y metabolismo animal deben ser considerados. Los ensayos de digestibilidad permiten examinar la proporción de nutrientes absorbibles presentes en una ración. La digestibilidad y el consumo son dos de los principales parámetros que definen la calidad de un alimento. La digestión incompleta representa la mayor pérdida en el proceso de utilización de la energía consumida.

El proyecto planteado en la Procesadora Nacional de Alimentos (PRONACA), Área de investigación y Desarrollo, y en el Departamento de Aseguramiento de Calidad, está encaminado a la implementación del método de análisis Cenizas Ácido Insolubles en laboratorio, y principalmente a contribuir con los aspectos más importantes como son el de mejoramiento de la calidad del alimento, lo que permitirá verificar la asimilación o aprovechamiento del alimento lo cual repercute en el incremento del peso y obtención de carne de buenas características.

El objetivo del presente trabajo de investigación es validar el método Cenizas Ácido Insolubles para determinar digestibilidad en alimento balanceado frente al método de referencia ya utilizado en el método de Recolección Total, para dicha validación se aplicara tres alternativas diferentes de establecer el método CIA para determinar digestibilidad en la Procesadora Nacional de Alimentos C.A. PRONACA Quevedo.

CAPÍTULO I

1. PARTE TEÓRICA

1.1. VALIDACIÓN

La validación de las metodologías, junto a otras actividades englobadas en el control del aseguramiento de la calidad, permite demostrar a los laboratorios que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables. (5)

“Validación es la confirmación mediante el examen y la provisión de una evidencia objetiva de que se han satisfecho unos requisitos particulares para un uso pretendido y específico”. Norma ISO 8402 (8)

La validación de métodos emplea un conjunto de pruebas que comprueban todas las hipótesis en las que se basa el método analítico, y establecen y documentan las características de rendimiento de un método, demostrando así si dicho método es adecuado para un propósito analítico particular. Las características de rendimiento de los métodos analíticos son: la aplicabilidad, la selectividad, el calibrado, la veracidad, la fidelidad, la recuperación, el rango de funcionamiento, el límite de cuantificación, el límite de detección, la sensibilidad y la robustez. Pueden añadirse la incertidumbre de la medición y la adecuación al propósito. (10)

Validar un método analítico consiste en verificar y documentar su validez, esto es, su adecuación a unos determinados requisitos, previamente establecidos por el usuario, para poder resolver un problema analítico particular. (5)

Estos requisitos son los que definen los parámetros o criterios de calidad que debe poseer el método a utilizar para resolver el problema analítico. (5)

Tipo estadístico	Tipo operativo/económico
✓ Veracidad, Trazabilidad	✓ Inversión
✓ Precisión, Incertidumbre	✓ Mantenimiento
✓ Representatividad	✓ Rapidez
✓ Sensibilidad	✓ Facilidad de uso
✓ Selectividad	✓ Simplicidad
✓ Límite de detección	
✓ Límite de cuantificación	
✓ Robustez	

FIGURA 1. PARÁMETROS DE CALIDAD DE UN MÉTODO ANALÍTICO

Según la norma ISO/IEC 17025, los laboratorios deben validar todos los métodos que se utilicen en el laboratorio, tanto los desarrollados por ellos mismos como aquellos procedentes de fuentes bibliográficas o desarrollados por otros laboratorios. Además, también es necesario que el laboratorio valide los métodos de referencia aunque, en este caso, no es necesario que el laboratorio realice una validación completa. (5)

Hay dos principales fuentes de referencia en la documentación de la OMS en relación con la validación. Recalca que la validación debe conducirse de conformidad con protocolos predefinidos. Deben prepararse y almacenarse informes escritos que resuman los resultados y las conclusiones registradas.

Los procesos y procedimientos deben establecerse sobre la base de un estudio de validación. Debe realizarse una revalidación periódica para asegurar que los procesos y los procedimientos sigan siendo capaces de lograr los resultados concebidos. (27)

La validación de procesos requiere la identificación de los elementos críticos del proceso de producción. También incluye calificación de los sistemas de apoyo como la producción de agua, los sistemas de suministro de aire y la calificación de equipo. (45)

Es de gran importancia la claridad de algunos términos, como los siguientes:

- **INCERTIDUMBRE DE MEDIDA** es el parámetro, asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mesurando (45)

- **ESPECIFICIDAD** es la habilidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se puede esperar que estén presentes. Típicamente éstos pueden incluir impurezas, productos de degradación, la matriz. (12)
- **EXACTITUD** se expresa la cercanía entre el valor que es aceptado, sea como un valor convencional verdadero (material de referencia interno de la firma), sea como un valor de referencia aceptado (material de referencia certificado o estándar de una farmacopea) y el valor encontrado (valor promedio) obtenido al aplicar el procedimiento de análisis un cierto número de veces.
- **INTERVALO DE LINEALIDAD** es el ámbito entre la menor y la mayor concentración de analito en la muestra (incluyendo éstas concentraciones) para las cuales se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene el nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad.
- **LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN** es la cantidad más pequeña del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable. Es un parámetro del análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y se usa particularmente para impurezas y productos de degradación. Se expresa como concentración del analito.
- **LÍMITE DE DETECCIÓN** es la cantidad más pequeña de analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, con un nivel de confianza determinado, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. Es comúnmente expresado como concentración del analito.
- **LINEALIDAD** es la habilidad (dentro de un ámbito dado) del procedimiento analítico de obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra.
- **REPETIBILIDAD** es la precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (mismo día), por un mismo analista, en la misma muestra homogénea y en el mismo equipo.
- **REPRODUCIBILIDAD:** se expresa la precisión entre laboratorios como resultado de estudios interlaboratoriales diseñados para estandarizar la metodología.
- **ROBUSTEZ** es la medida de la capacidad de un procedimiento analítico de permanecer inafectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y provee una indicación de su fiabilidad en condiciones de uso normales.

- **SELECTIVIDAD** esta describe la habilidad de un procedimiento analítico para diferenciar entre varias sustancias en la muestra y es aplicable a métodos en los que dos o más componentes son separados y cuantificados en una matriz compleja. (12)

1.1.1. VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ANÁLISIS



Fotografía N° 1. LABORATORIO BROMATOLÓGICO.

La validación de un método de análisis o ensayo se puede interpretar como el proceso de definir un requisito y confirmar que el método de ensayo bajo consideración tiene capacidades de desempeño consistentes con lo que la aplicación requiere en el laboratorio de análisis (*Ver Fotografía N° 1*). Por consiguiente, como algo implícito, es necesario evaluar la capacidad de desempeño del método. El juicio de la conveniencia del método es importante; en el pasado la validación de método se tendió a concentrar en el proceso de evaluación de los parámetros de desempeño. (27)

También, está implícito en el proceso de validación del método que los estudios para determinar los parámetros de desempeño del método son llevados a cabo utilizando equipos que están trabajando correctamente dentro de sus especificaciones y adecuadamente calibrados. Igualmente, el analista que lleva a cabo los estudios debe ser competente y debe tener conocimiento suficiente en el campo de trabajo, lo que le facilita poder tomar decisiones apropiadas a partir de las observaciones realizadas o de los procesos del estudio.

La validación se considera muy cercana al desarrollo del método, de hecho no es a menudo posible determinar exactamente donde finaliza el desarrollo del método y comienza la validación. (27)

1.1.2. GUÍA PARA VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO

La realización de actividades de validación de los métodos de ensayo utilizados por el propio laboratorio, contemplan la satisfacción de las necesidades del cliente y la adecuación para realizar los ensayos previstos. (49)

El laboratorio debe confirmar que puede aplicar correctamente los métodos normalizados, previo a su uso en ensayos o calibraciones. Cualquier variación en el método normalizado implica la repetición de dicha confirmación.

Para el caso de metodologías de ensayo o de calibración desarrolladas por el laboratorio los métodos deben ser adecuada y totalmente validados antes de su uso. (49)

Los equipos también deben ser calibrados o validados antes de su uso.

1. REQUISITOS GENERALES

1.1. Principio de la validación

Cada validación de un procedimiento consiste en tres pasos.

1. Establecimientos de las condiciones por cumplir (*por ejemplo*: límite de detección <1 mg/L, intervalo lineal mayor a 2 órdenes de magnitud, incertidumbre de los resultados <20% en todo el intervalo de trabajo, para el caso de la validación de un método analítico general. No puede establecerse como principio de validación para otros tipos de métodos de ensayo).

2. Determinación de los parámetros estadísticos del procedimiento.

3. Valoración de los resultados de la validación por comparación de los parámetros estadísticos obtenidos con las condiciones y decisión sobre la validez del procedimiento para el propósito establecido. (45)

2. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES Y ALCANCE DE LA VALIDACIÓN

2.1. Establecimiento de las condiciones

En el caso más sencillo ya fueron establecidas por el cliente del laboratorio o por alguna instancia oficial. Si éste no es el caso, el responsable del ensayo debe establecerlas lo más de acuerdo posible con el cliente del laboratorio. Cuando no es posible contactar al cliente del laboratorio, debe definir las el responsable del ensayo de manera confiable y científica. El laboratorio debe contar con zonas adecuadas para los análisis para que de este modo se disminuya el riesgo de la presencia de interferencia en los resultados (*Ver Fotografía N° 2*) (45)



Fotografía N° 2. CONDICIONES EN LABORATORIO BROMATOLÓGICO

2.2. Establecimiento del alcance de la validación

Se diferencian tres casos, en los que la dificultad de la validación aumenta del primero al tercero:

1. Se trata de un método de ensayo estandarizado y normalizado, que se aplica exactamente como está descrito en la norma.
2. Se trata de una modificación a un método de ensayo normalizado, por ejemplo, se hicieron modificaciones a los métodos descritos en la norma que pueden tener una repercusión sobre la calidad de los resultados. Ejemplos: un método de extracción diferente, otra matriz.
3. Se trata de un método de ensayo interno, elaborado en el laboratorio y que no se encuentra en normas u otras colecciones de métodos. (49)

La validación en los casos descritos tiene objetivos distintos y, por lo tanto, diferentes puntos esenciales, como muestra la Tabla N° 1.

TABLA N°1. OBJETIVOS DE LA VALIDACIÓN SEGÚN EL TIPO DE PROCEDIMIENTO DE ENSAYO.

Método de ensayo	Objetivos de la validación
Caso 1: método normalizado	Comprobación de que el laboratorio domina el ensayo y lo utiliza correctamente.
Caso 2: modificación de un método normalizado	Comprobación de que la repetibilidad, la reproducibilidad, la precisión intermedia y la exactitud del método original no dependen de la modificación introducida y que el laboratorio domina el ensayo y lo utiliza correctamente.
Caso 3: método interno	Comprobación de que el método tiene la repetibilidad, la reproducibilidad, la precisión intermedia y la exactitud suficientes para el objetivo de aplicación y que el laboratorio domina el ensayo y lo realiza correctamente.

FUENTE: OAO, GUÍA PARA VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO 2003

TABLA 2. ALCANCE DE LA VALIDACIÓN SEGÚN EL TIPO DE PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Método de ensayo	Parámetros estadísticos recomendados / medidas de validación
Caso 1: método normalizado	<ol style="list-style-type: none"> 1. Comprobación del cumplimiento de los parámetros estadísticos, p. ej. incertidumbre de los resultados, repetibilidad, exactitud, límite de detección (siempre y cuando se indiquen en la norma). 2. Elaboración de una carta de control analizando un material de referencia. 3. Participación en ensayos interlaboratorios.
Caso 2: Modificación de un método normalizado	4. Además de lo indicado para el caso 1 de esta Tabla, probar parámetros estadísticos determinados, ver 2.2.1.
Caso 3: Método interno	5. Además de lo indicado para el caso 1 de esta Tabla, probar todos los parámetros estadísticos posibles, ver 2.2.2

FUENTE: OAO, GUÍA PARA VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO 2003

Dependiendo de las características del método se determina los parámetros estadísticos a comprobarse, como se muestra en la Tabla N° 2. El alcance de la validación determinado por el responsable del ensayo, o bien los parámetros estadísticos por determinar y, en caso necesario, los principios aplicados deben ponerse por escrito en forma de informe de validación. (49)

2.2.1. Parámetros determinados

Los parámetros que vienen al caso determinar, para el caso de química analítica, son.

- Intervalo de trabajo / linealidad
- Tipo de ajuste
- Recuperación
- Robustez
- Especificidad
- Estabilidad
- Reproducibilidad

Estos deben determinarse solamente cuando a juicio profesional es de esperarse un posible efecto debido a una modificación del método de ensayo. (49)

Ejemplos de lo anterior se encuentran en la tabla 3.

TABLA N° 3. EFECTO DE MODIFICACIONES AL MÉTODO DE ENSAYO SOBRE LOS PARÁMETROS A DETERMINAR

Modificación	Ejemplos de los posibles efectos sobre:
Método de extracción	Porcentaje de recuperación
Matriz de la muestra	Especificidad, porcentaje de recuperación
Cambios en el pH	Robustez
Cambio de operador	Repetibilidad- Límite de detección- exactitud (sesgo)
Detección	Intervalo de trabajo / linealidad, eventualmente especificidad.

FUENTE: OAO, GUÍA PARA VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO 2003

2.2.2. Todos los parámetros posibles (además de los indicados en el caso 1 y 2)

Para los métodos internos no existen indicaciones concretas para validar un procedimiento. Por lo tanto deben ser determinadas todas las aplicables.

Especificidad, selectividad, linealidad, Intervalo de trabajo, repetibilidad, reproducibilidad intermedia, estabilidad, reproducibilidad, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, recuperación, robustez a las influencias externas, sensibilidad cruzada frente a las interferencias provenientes de la matriz de la muestra o del objeto de ensayo, incertidumbre de los resultados.

3. INFORME DE VALIDACIÓN DE UN MÉTODO

Cada validación debe ir acompañada de un informe:

El mismo debe ser preparado por el analista/operador/ técnico y revisado por Personal Calificado. (49)

En la realización del Informe de Validación deberán considerarse los siguientes puntos, cuando corresponda:

- Objetivo y alcance del método.

- Ítem a ensayar.
- Detalle de insumos, reactivos, materiales de referencia y acondicionamiento de las muestras.
- Lista de equipos, instrumentos y dispositivos.
- Parámetros de validación con sus resultados.
- Registro de las condiciones de los ensayos y gráficos representativos (curva de calibración, registros de correlación) y cálculos necesarios.
- Incertidumbres de las mediciones.
- Resultados obtenidos.
- Personas que desarrollaron la validación del método.
- Conclusiones, criterios de aceptación o rechazo, criterios de revalidación.

Al final de un procedimiento de validación debe tomarse una decisión sobre la aptitud para la aplicación del método. De esta manera se confrontan los parámetros estadísticos del método obtenidos, o bien las medidas de validación (cartas de control, ensayos de intercomparación) con lo establecido, en forma de informe final (planilla *ad hoc*). (45)

Puede ocurrir que uno de los puntos del informe no concuerde con lo establecido en la instrucción de trabajo correspondiente a ese método de ensayo (por ejemplo repetibilidad del 7% en vez del 5% exigido) y que de todas maneras, se considere el método adecuado. Esto debe ser fundamentado en el ámbito de la validación por el responsable del ensayo. (45)

1.1.3. DETERMINACIONES DE PARÁMETROS ESTADÍSTICOS Y REALIZACIÓN DE LAS MEDIDAS DE VALIDACIÓN PARA EL CASO DE MÉTODOS QUÍMICOS DE ANÁLISIS.

La validación de métodos de análisis, e implementación los métodos depende de los resultados obtenidos en los parámetros estadísticos de validación, rigiéndose a especificaciones establecidas según la norma INEN-ISO/IEC 17025:2000, como muestra la Tabla N° 4.

TABLA N° 4. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN CON LA TOLERANCIA EN SUS RESULTADOS.

PARÁMETRO	OBJETIVO
Selectividad/Especificidad	Conocimiento de interferencias
Linealidad/Función respuesta	Regresión lineal. Grado de ajuste $r^2 \geq 0,99$ Se determinarán los coeficientes de regresión y sus intervalos de confianza al 95%
Límite de detección	$\leq 1 \text{ mg/l}$
Límite de cuantificación	$\leq 8 \text{ mg/l}$ (%U < 15%, p= 95%)
Precisión(repetibilidad y/o reproducibilidad)	sR < 5%CV, en todos los niveles
Exactitud	% de Recuperación entre 95 % y 105% en todos los niveles
Incertidumbre	%U < 15%, p = 95%
Intervalo de trabajo	10 mg/l a 40 mg/l

FUENTE: INEN-ISO/IEC 17025:2000. VALIDACIÓN DE MÉTODOS

1. Incertidumbre de los resultados

Incertidumbre es definido como el parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mesurando (desviación estándar).

La incertidumbre de una medida se expresa con un factor k denominado factor de cobertura, el cual es necesario indicar para conocer cuál es el nivel de confianza. Este k se elige en base al nivel de confianza requerido para el intervalo $\pm U$. La incertidumbre es una estimación de los valores con respecto al valor medio, por lo que es necesario expresarla con un determinado nivel de confianza (relacionado con el factor de cobertura k). En base al Teorema Central del Límite, cuando la distribución es normal, la elección será del factor $k=2$ que proporciona un intervalo con un nivel de confianza en torno al 95% de probabilidad de que contenga al valor verdadero. (52)

La incertidumbre de resultados obtenidos con el método analítico se obtiene a partir de la desviación estándar de los resultados obtenidos. En concreto, la incertidumbre debe obtenerse multiplicando la desviación estándar de la reproducibilidad, s_R , por el factor de cobertura k , ($U=k \cdot s_R$). (52)

Es un parámetro de identificación central e inalienable para preparar una acreditación según Guía ISO 17025. Incluye los errores sistemáticos y aleatorios. Para su determinación y especificación existen varias posibilidades:

- Indicación acerca de la repetibilidad.
- Resultados de las cartas de control.
- Resultado de intercomparaciones.
- Evaluación por miembros del personal experimentados, competentes y, por lo tanto, autorizados. (12)

2. Repetibilidad

Puede determinarse de una manera interna. Para ello es necesario tener en cuenta que:

- Deben determinarse suficientes resultados.
- Todos los pasos del método (incluidas la toma y preparación de la muestra, así como la calibración) deben realizarse n -veces. (12)

3. Reproducibilidad

Su determinación tiene sentido y es posible solamente cuando otros laboratorios cercanos utilizan el método de ensayo y es posible una “comparación interlaboratorios” o cuando se realiza un ensayo de intercomparación. (45)

4. Elaboración de una carta de control analizando un material de referencia

La elaboración de una carta de control es el método de elección para el control interno de rutina de métodos utilizados frecuentemente. Las cartas de control no son adecuadas para métodos que se utilicen menos de alrededor de tres veces al mes.

Para ellos se analiza una muestra de control (muestra de retención de una muestra real o un material de referencia certificado o no) junto con las muestras del análisis y el resultado se anota en la carta de control.

Las variantes más importantes son:

- Carta de control de un sólo valor
- Carta de control del blanco
- Carta de control para recuperación

El procedimiento es en principio el mismo para todos los casos. La diferencia se encuentra en el factor que se controla (contenido del analito, blanco o bien porcentaje de recuperación). (49)

5. Participación en intercomparaciones

Deben tomarse en cuenta los siguientes puntos:

- Las intercomparaciones dan información valiosa solamente cuando las muestras se manejan de la misma manera que las muestras de un análisis normal.
- Las intercomparaciones se realizan en intervalos de tiempo largos. De ahí que no sean suficientes para el aseguramiento de calidad rutinario, sino que funcionan como complemento de las cartas de control, por ejemplo
- Entre más distintas sean las matrices de las muestras de intercomparación y las del análisis, menos información dan las intercomparaciones para el análisis rutinario.

- La interpretación de los resultados de intercomparaciones debe realizarse con el mayor cuidado, especialmente en el caso de resultados aberrantes o desviaciones, para obtener la mayor posibilidad de mejora.
- Si no se organizan intercomparaciones oficiales o provenientes de proveedores reconocidos, se pueden realizar en su lugar comparaciones con otros laboratorios.(12)

6. Intervalo de trabajo

El ámbito de trabajo de un método analítico es el intervalo entre los niveles más bajo y más alto de concentraciones que ha sido demostrado que puede ser determinados con la precisión y la exactitud requeridas para una determinada matriz.

a) Se preparan un blanco y seis concentraciones diferentes del analito a determinar o seis muestras fortificadas a varias concentraciones. Preferiblemente las soluciones se deben preparar independientemente y no a partir de diluciones sucesivas del material de referencia.

b) Se representa la señal obtenida en función de la concentración y se determina el ámbito lineal y los extremos superior e inferior del intervalo de trabajo.

Se repiten los pasos a y b dentro del ámbito lineal y se efectúa un estudio estadístico de los resultados obtenidos.

d) Es preferible trabajar dentro del ámbito lineal.

e) Para la curva de calibración, es conveniente utilizar polinomios de ajuste de grado 2 como máximo. (45)

7. Ámbito lineal

Es la parte de la función de calibración en la que la señal obtenida para el analito responde “linealmente” a la concentración. Se verifica mediante la obtención de coeficientes de correlación mayor o iguales a 0,995. (45)

8. Recuperación

El porcentaje de recuperación es el cociente entre la cantidad de analito medida y el contenido en la muestra. En el caso ideal, se obtiene un 100%. Para calcular la recuperación se determina la función de recuperación. Para lo cual se agregan a la muestra antes del tratamiento cantidades sucesivas del analito y se determinan contra una calibración base. Las cantidades encontradas se grafican contra las agregadas. En el caso ideal los valores caen en la bisectriz de la incertidumbre de los resultados. En este caso de recuperación es del 100% y es suficiente una calibración base, analito en un disolvente. (49)

Si los valores se salen de este marco, debe hacerse una calibración a partir de matriz y analito en un disolvente para eliminar el efecto de la matriz.

Variando el tiempo de adición del analito (por ejemplo, antes y después de un paso de concentración) puede determinarse la recuperación para pasos aislados de un procedimiento. (45)

Este método conduce a un aumento claro en la concentración del analito. Para mantener el error lo más pequeño posible, las cantidades añadidas deben ser tales que no sobrepasen el intervalo de trabajo. (12)

9. Límite de detección

Es necesario solamente cuando deben tomarse decisiones cualitativas, es decir, si el analito está presente o no. Los procedimientos de determinación posibles son:

- Tres veces la dispersión, expresada como desviación estándar, a partir de mediciones repetidas del blanco (válido solamente para procedimientos con blanco), o de soluciones del analito en agua pura.
- De dos punto cinco a cinco veces la relación señal/ruido del instrumento de medida a utilizar. (45)

10. Límite de cuantificación

Se emplea cuando se realizan determinaciones de analitos a nivel de trazas.

En esencia se encuentran en la literatura dos formas para determinarla:

- De manera análoga al límite de detección, en el cual el límite de cuantificación es *como mínimo* tres veces el límite de detección, según cada caso.
- Por determinación de una incertidumbre de los resultados máxima permisible (dada como dispersión relativa del 30%, por ejemplo) por medio de la determinación de la concentración más pequeña que se puede medir con este valor máximo. Este límite de cuantificación es, por lo tanto, dependiente de las exigencias de la incertidumbre. (12)

11. Robustez

El objetivo de la prueba de robustez es optimizar el método analítico y describir que bajo las condiciones establecidas (incluidas sus tolerancias) se pueden obtener resultados suficientemente exactos con una alta seguridad, de manera que el procedimiento funcione confiablemente si se utiliza en otros laboratorios o después de intervalos largos de tiempo.

Para determinar la robustez de un procedimiento analítico pueden modificarse algunas condiciones del análisis y seguir las afectaciones a los resultados o a los parámetros estadísticos. Un aspecto importante de la robustez es la estabilidad de todas las muestras, estándares y reactivos, tanto en el almacenamiento como durante las condiciones de ensayo. (49)

12. Especificidad

La especificidad sugiere que ningún compuesto excepto el analito contribuye al resultado de un ensayo. Esto se logra casi únicamente con las técnicas acopladas. Para probar esto hay varias posibilidades. (45)

La especificidad puede verificarse de diferentes maneras, dependiendo del tipo de análisis a realizar. Es importante tomar en cuenta, que en aquellos casos en que la matriz de la muestra es variable, tanto en términos de su composición, así como en la fuente de las materias primas que las componen, se recomienda que la especificidad se establezca para las diferentes composiciones o fuentes en forma independiente. (12)

Comparación de métodos

Verificación

En los casos en que los patrones de impurezas no están disponibles, la especificidad puede ser demostrada por comparación de los resultados del ensayo con el método propuesto, con resultados obtenidos por un segundo método bien caracterizado u oficial. La comparación debe incluir muestras almacenadas bajo condiciones extremas relevantes (luz, calor, humedad, hidrólisis ácida o básica, oxidación). Estas condiciones deben ser escogidas de acuerdo a la estructura química del analito, que determinará la susceptibilidad del mismo a la descomposición.

Criterio de aceptación

En el caso de la determinación cuantitativa de impurezas, se deben comparar los resultados obtenidos por ambos métodos. En el caso de pruebas de impurezas cromatográficas, se deben comparar los perfiles de impurezas. (12)

13. Selectividad

La selectividad da una indicación de cuan fuertemente un resultado es afectado por otros componentes de la muestra. (45)

14. Exactitud

Para la evaluación de este parámetro se realiza el análisis de un material de referencia certificado, preferentemente con una matriz semejante a la de la muestra. Sólo en el caso de no existir un material adecuado se puede realizar un ensayo de recuperación.

Cuando sea posible, se realizan un mínimo de 10 repeticiones del ensayo tres días consecutivos. (45)

1.1.4. REGLAMENTOS DE VALIDACIÓN

La validación de métodos es una de las medidas universalmente reconocidas como parte necesaria de todo sistema completo de garantía de calidad en la química analítica. En el pasado ISO, IUPAC (Unión internacional de química pura y aplicada) y AOAC INTERNATIONAL han cooperado para elaborar protocolos o directivas comunes sobre Realización e Interpretación de Estudios de la eficiencia de los Métodos, sobre Ensayos de Aptitud de Laboratorios de Química Analítica, sobre Control Interno de Calidad en Laboratorios de Química Analítica y sobre Uso de Datos de Recuperación en las Mediciones Analíticas. La IUPAC ha encargado ahora al grupo de trabajo que elabore estos protocolos/directrices para establecer directrices de validación de métodos de análisis en un solo laboratorio. Dichas directrices ofrecen unas recomendaciones mínimas sobre los procedimientos que deben seguirse para garantizar una validación adecuada de los métodos analíticos. (32)

Se discutió un borrador de las directrices durante el Simposio Internacional sobre Armonización de Sistemas de Garantía de Calidad en Laboratorios Químicos, cuyas actas han sido publicadas por la Royal Society of Chemistry del Reino Unido. (Resultados del Simposio sobre Armonización de Sistemas de Garantía de Calidad para Laboratorios Analíticos, Hungría, 4-5 de noviembre de 1999) patrocinado por IUPAC, ISO y AOAC INTERNATIONAL. (32)

En algunos sectores, y en particular en el análisis de los alimentos, la necesidad de utilizar métodos “totalmente validados” está estipulada por la legislación. (*Procedural Manual of the Codex Alimentarius Commission, 10th Edition*, FAO, Roma, 1997). La validación “total” de un método analítico suele incluir un examen de las características del método mediante un estudio inter-laboratorio del rendimiento del método. Se han elaborado protocolos internacionalmente aceptados para la validación “completa” de los métodos de análisis mediante ensayos colectivos, en especial el Protocolo Internacional Armonizado y el procedimiento ISO. Estos protocolos o estándares precisan que se incluyan en el ensayo colectivo un número mínimo de laboratorios y de materiales de ensayo sometidos al estudio inter-laboratorios para validar completamente el método analítico. Sin embargo, no siempre es práctico o necesario realizar una validación total de

un método de análisis. En tales casos, puede resultar adecuado llevar a cabo una “validación interna del método” efectuada en un solo laboratorio. (32)

Entre las agencias reguladoras más importantes se tiene a nivel internacional la Food and Drug Administration (FDA) y la International Conference on Harmonization (ICH), a través de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL). Así pues, una de las herramientas con las que se cuenta para asegurar la calidad de los productos y procedimientos es la validación de los mismos, por lo cual, la adopción de un nuevo método analítico debe estar soportado por suficientes datos de laboratorio y una validación bien documentada, que cumpla con los requisitos establecidos por instituciones internacionales como la FDA, el ICH.

1.1.5. PROTOCOLOS, ESTÁNDARES Y GUÍAS EXISTENTES

Se han elaborado varios protocolos y directrices de validación de métodos e incertidumbres, principalmente por parte de AOAC INTERNATIONAL, la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) y en documentos del Eurachem:

- El manual de estadística de la AOAC, que recomienda llevar a cabo estudios en un solo laboratorio antes de realizar ensayos colectivos.
- El texto y la metodología de la ICH, que prescriben los requisitos mínimos del estudio de validación para las pruebas utilizadas para presentación de medicamentos para su aprobación.
- La adecuación al propósito de los métodos analíticos: guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1998)
- Cuantificación de la incertidumbre en las mediciones analíticas (2000)

La validación de métodos también se discutió ampliamente en una consulta conjunta a expertos de la FAO/IAEA, celebrada en diciembre de 1997, sobre la validación de métodos analíticos para el control alimentario. (35)

1.2. DIGESTIBILIDAD

La digestibilidad es uno de los factores más importantes para evaluar la calidad nutritiva de las raciones que consumen los animales domésticos, porque indica el grado en que los nutrientes de los ingredientes van a ser aprovechados directamente por el animal. Una buena digestibilidad de la dieta resultará en una mayor productividad por parte del animal. Existen diferentes maneras de determinar la digestibilidad de los nutrientes, tales como las pruebas de digestibilidad *in vivo* (método de colección total o parcial), digestibilidad *in situ* y digestibilidad *in vitro*. En el caso de bovinos productores de leche o de carne se hace más difícil llevar a cabo una prueba *in vivo*. Una alternativa es la colección parcial de las heces, pero incluyendo algún tipo de marcador. Existen marcadores externos e internos los cuales son sustancias que no son absorbidas por el animal, no tienen efecto en la digestión y son fáciles de medir; los marcadores externos se adicionan a la dieta y se recolectan en las heces. Los marcadores internos se encuentran en el alimento, cenizas insoluble en ácido es considerado un marcador interno (34)

El proceso digestivo es específico para cada especie animal, pero puede agruparse a los animales en dos grupos importantes según su fisiología digestiva: monogástricos, que comprende cerdos, conejos, caballos y aves; y poligástricos o rumiantes, que incluye a los bovinos, ovinos y caprinos

Las diferencias más importantes entre unos y otros afectan a la digestión de los hidratos de carbono, cuyos nutrientes finales son básicamente glucosa en los monogástricos y ácidos grasos volátiles en los rumiantes. La principal función de la glucosa y de los ácidos grasos volátiles en el animal será el suministro de energía, aunque también intervienen en la síntesis de otros compuestos, tales como la lactosa de la leche. (18)

La digestión de las proteínas presenta notables diferencias en unos y otros. En los dos casos los nutrientes finales son aminoácidos, pero mientras que en los monogástricos éstos serán sólo aquellos que se encontraban en los alimentos, en los rumiantes, proceden en parte de los alimentos y en parte de los microorganismos que se encuentran en su tubo digestivo. Los aminoácidos serán utilizados por el animal para la síntesis de proteínas principalmente.

La digestión de las grasas, proporciona a los dos grupos de animales monoglicéridos, ácidos grasos y glicerina, cuyo destino principal será proporcionar energía al animal.

Como resultado del proceso digestivo el valor potencial de un alimento, que habíamos estimado por su composición en principios inmediatos, se ve reducido a aquella parte de los nutrientes que es absorbida, el resto de ellos, no digerido, se pierde con las heces. (21)

Para cuantificar la pérdida asociada al proceso digestivo se emplea el concepto de nutriente digestible, que se calcula como diferencia entre nutriente ingerido por el animal y nutriente excretado en las heces durante un período determinado de alimentación, y se expresa normalmente en porcentaje (Coeficiente de digestibilidad, CD)

$$CD = \frac{\text{Nutriente ingerido} - \text{nutriente en heces}}{\text{Nutriente ingerido}} \times 100$$

Composición del material fecal

- 1.- Residuo no ingerido
- 2.- Sustancias de origen endógeno y microbiano
 - a. Residuos de bilis y de jugos gástrico, pancreático y entérico
 - b. Restos celulares de la mucosa intestinal
 - c. Productos de excreción eliminados por el intestino
 - d. Restos celulares y microorganismos del intestino grueso o de los estómagos de los rumiantes

Factores que afectan a la digestibilidad

- 1.- Factores ligados al animal
 - a. Especie:
 - diferente estructura anatómica y funcional

- diferente capacidad de digestión y utilización de alimentos, fibra, almidón
- b. Raza: escasas diferencias
- c. Individuos: causas patológicas, defectos de dentadura, parasitismo intestinal.
- d. Edad: mejor digestibilidad en animales jóvenes

2.- Factores ligados al alimento

- a. Nivel de alimentación
- b. Composición química de la ración. (44)

1.2.1. Determinación de la Digestibilidad de los Alimentos

El conocimiento del valor nutritivo de los alimentos es fundamental para la nutrición animal, no siendo suficiente con los análisis químicos, hay que considerar los efectos de los procesos de digestión, absorción y metabolismo animal (Bondi, 1989). Las pruebas de digestibilidad permiten estimar la proporción de nutrientes presentes en una ración que pueden ser absorbidos por el aparato digestivo quedando disponibles para el animal. (44)

La digestibilidad depende mayormente de la composición nutritiva de la ración en estudio, siendo a su vez afectada por el hecho de que las heces contienen cantidades importantes de materiales de origen no dietético (Merchen, 1993). Éstas, constituyen una importante vía de excreción de compuestos nitrogenados, grasos, minerales y glúcidos no fibrosos de origen endógeno (Church y Pond, 1994), encontrándose reportes que indican que no hay secreción de carbohidratos a nivel intestinal (Bondi, 1989). A esto se debe que los coeficientes de digestibilidad determinados por diferentes métodos se denominan “aparentes”. Es difícil cuantificar con exactitud las cantidades de origen endógeno de un determinado elemento presente en las heces, ocasionando la subestimación de su digestibilidad verdadera. (34)

Los valores estimados de digestibilidad aparente de las fracciones correspondientes a proteínas y lípidos, sin incluir los aportes de compuestos endógenos de la misma naturaleza, son siempre menores a los coeficientes de digestibilidad verdadera. Por lo que

un dato de gran utilidad al trabajar con rumiantes es que el aporte de nitrógeno endógeno se encuentra alrededor de 0,5 a 0,6 g por 100 g de materia seca consumida (aproximadamente un 4% de la proteína de la ración), por lo que los coeficientes de digestibilidad aparente en raciones con un contenido de proteína inferior al 4%, son negativos.

En dietas basadas en el consumo de forrajes, la digestibilidad *in vivo* es afectada por aquellos elementos que tienen efecto sobre el consumo, como la capacidad de selección del animal en función de la oferta de material, la disponibilidad de agua, la tasa de pasaje del alimento, la eficiencia metabólica de los animales y hasta las condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa), lo que trae como consecuencia, que difícilmente la técnica *in vitro* pueda reproducir las transformaciones ocurridas en la digestibilidad *in vivo* (Cochran *et al.*, 1986).

Aún cuando la digestibilidad aparente, constituye una expresión muy simplificada del valor nutritivo, los datos que se generan de esta determinación son de gran utilidad. (36) Para la determinación *in vivo*, del coeficiente de digestibilidad de raciones completas o de determinados nutrientes dentro de una ración, se han empleado diversos métodos, entre los cuales destacan, el de colección total de heces y el método de las proporciones usando marcadores. (44)

1.2.2. Generalidades sobre el Uso de Marcadores para Ensayos de Digestibilidad.

Los marcadores son compuestos de referencia usados para monitorear aspectos físicos, como la tasa de pasaje, y químicos, como hidrólisis y síntesis, haciendo estimaciones cuantitativas o cualitativas de la fisiología nutricional. Estos materiales también han sido denominados como indicadores, trazadores, sustancias de referencia o sustancias indicadoras, y se ha denotado de manera especial, como marcadores de las dietas, a aquellos que pueden ser colocados en ella, pueden ser constituyentes naturales de la misma o ser administrados de forma oral. (44)

Para ser considerada como marcador, una sustancia debe ser inerte y no tóxica, no tener efectos fisiológicos o psicológicos, no puede ser absorbida ni metabolizada en su paso por el tracto digestivo y debe ser recuperada completamente tanto de materias primas como de alimentos procesados, debe mezclarse íntimamente con el alimento y mantenerse uniformemente distribuida en la digestión, no tener influencia sobre las secreciones alimentarias, digestión, absorción, motilidad del tracto digestivo o sobre la excreción, no tener efecto sobre la microflora del tracto digestivo de importancia para el hospedero; además, debe tener cualidades que permitan su medición precisa. (44)

La metodología con marcadores ha sido ampliamente estudiada para ensayos de digestibilidad, reconociendo que los coeficientes de digestión pueden ser determinados sin la CTH, tanto para animales en confinamiento como para animales a pastoreo, en ocasiones cuando se dificulta medir el consumo total de alimento o cuando se hace imposible colectar la totalidad de las heces. Bajo estas condiciones es deseable el uso de marcadores siendo necesario, conocer la concentración de la sustancia de referencia en el alimento y en las heces siempre que se identifique el marcador apropiado. (41)

El uso de marcadores ofrece una serie de ventajas en relación con el método de CTH, es menos laborioso y no requiere de la medición del consumo del alimento a evaluar y su excreción fecal, ya que las determinaciones pueden ser realizadas directamente sobre muestras del alimento y de las heces.(41)

Los diferentes estudios con marcadores demuestran que reunir todos estos requisitos es prácticamente imposible, por lo que en ensayos de digestibilidad se han considerado la indigestibilidad, la recuperación completa y la fácil medición del material, como las principales características que debe cumplir un marcador. Adicionalmente, no debe afectar el animal, no interferir la digestibilidad del alimento, ni estar presente en la dieta o en el suelo y debe contar con un método específico y sensible para su determinación.

Los marcadores han sido clasificados bajo diversos criterios siendo su naturaleza el más común, regularmente divididos en internos y externos. Adicionalmente, incluye una tercera categoría, los generados matemáticamente (como el nitrógeno fecal). Los internos son aquellos, como la lignina, que son constituyentes naturales del alimento no digeridos ni absorbidos por el animal o que se digieren en muy poca cantidad su utilización es

ventajosa gracias a que por ser componentes indigeribles de los alimentos, no es necesaria la preparación del marcador. (44)

Los externos, son sustancias químicas que se suministran al animal, bien sea directamente con la ración, en cápsulas o en soluciones y, que al igual que los internos no son digeridos ni absorbidos.

Varios métodos han sido propuestos para simplificar las determinaciones de los coeficientes de digestión, siendo el más popular el de las proporciones usando marcadores. Éste se muestra como un procedimiento altamente válido que permite su estimación en función de la concentración del indicador en el alimento y en las heces. Al determinar con precisión las cantidades de marcador suministrado en el alimento y en muestras de heces, y conocer la composición porcentual de los nutrientes presentes en el alimento y las heces, se determina, a partir de la relación entre esas concentraciones, la digestibilidad de los nutrientes. (36)

Para el cálculo de la digestibilidad con marcadores, según la técnica de las proporciones, se han descrito algunas fórmulas, en función de la relación de las concentraciones de los nutrientes y el marcador, tanto en la ración como en las heces. En el caso de la digestibilidad de la MS y cualquier otro nutriente se han propuesto la siguiente formulas:

$$DMS, \% = (1 - CMF/CMH) \times 100$$

Donde:

CMF = Concentración del marcador en el forraje (%)

CMH = Concentración del marcador en las heces (%)

Para calcular la digestibilidad de cualquier nutriente (DN), se aplica alguna de estas fórmulas según su preferencia:

$$DN, \% = [1 - (CMF \times NH)/(CMH \times NF)] \times 100$$

Donde:

CMF = Concentración del marcador en el forraje (%)

NH = Concentración del nutriente en las heces (%)

CMH = Concentración del marcador en las heces (%)

NF = Concentración del nutriente en el forraje (%)

$$\text{Digestibilidad aparente, \%} = 100 - [100 (\text{MA}/\text{MH})(\text{NH}/\text{NA})]$$

Donde:

MA =% de marcador en el alimento

MH =% de marcador en las heces

NH =% de nutriente en las heces

NA =% de nutriente en el alimento.

La precisión y la efectividad de las estimaciones de digestibilidad se ven afectadas por las variaciones en las determinaciones del marcador. Dichos errores se traducen en una subestimación de los coeficientes de digestión, pudiendo ser ajustados con la introducción de un factor de corrección estimado con la digestibilidad determinada en por el método de CTH. Esto sólo se justifica en el caso de los marcadores internos, pero no en el uso de sustancias metabólicas o marcadores externos, donde vendría a ser un correctivo para encubrir fallas en la técnica. (44)

La validez del uso de marcadores en estudios a pastoreo depende de la habilidad de los investigadores para obtener muestras representativas de las heces producidas y del forraje consumido. Sin embargo, el marcador nutricional ideal, que cumpla con todos los requisitos establecidos y sea aplicable en condiciones variables, no ha sido encontrado, aún cuando algunos marcadores han resultado exitosos para una aplicación específica. (44)

1.3. ENERGÍA BRUTA (EB)

Energía bruta es la energía combustible total de un producto alimenticio y no difiere mayormente de un alimento a otro, excepto los ricos en grasas. Es la energía liberada como calor cuando una sustancia orgánica es oxidada totalmente a CO₂ y H₂O. Es el punto de partida para conocer la energía de un alimento o de una ración, que es utilizada en los procesos corporales. La Energía bruta de un alimento al ser ingerido y utilizar sus

nutrientes, aporta energía digestible pero una parte se elimina en las heces, como muestra la Figura N° 2.

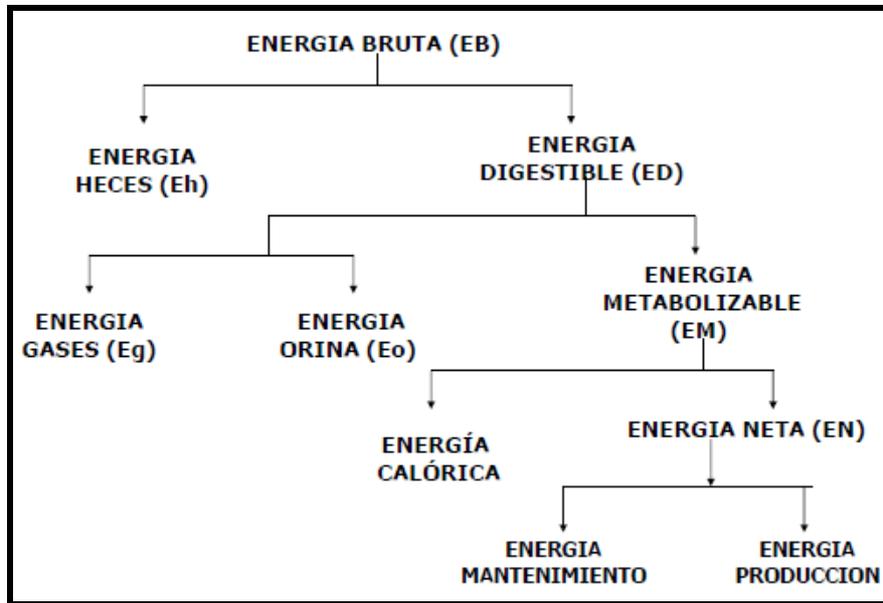


FIGURA N°2. ESQUEMA CONVENCIONAL DE PARTICIÓN DE ENERGÍA

Formas de determinación

El contenido de energía es determinado a través de en un peso dado de un compuesto, medido como calor de combustión en un calorímetro (bomba calorimétrica). (Ver *Fotografía N° 3*). Estimación a partir de la composición química (análisis de Weende) y los valores de combustión de los carbohidratos, proteínas y lípidos



Fotografía N° 3. BOMBA CALORIMÉTRICA

1.3.1. ENERGÍA DIGESTIBLE (ED)

Energía digestible de un alimento es la porción de la EB que no se excreta con las heces. Es la parte de la energía alimentaria consumida que no aparece en las heces

$$ED = EB - (E \text{ heces} - E \text{ endógena})$$

En el proceso de utilización de la energía ingerida la pérdida en las heces es la primera y, cuantitativamente, la más importante y más variable. (ED = 30 - 90 % de EB)

Determinación de Energía Digestible

- Calorimetría (bomba calorimétrica): restando a la EB consumida la EB de las heces se obtiene la energía digestible aparente.
- Estimaciones a partir de composición química de ingerido y excretado
- Determinación de Nutrientes Digestibles Totales (NDT)

1.3.2. ENERGÍA METABOLIZABLE (EM)

Energía metabolizable es la porción de la EB que no se pierde con las heces, la orina ni los gases. Aunque la EM refleja con más exactitud la energía útil que contiene un alimento, no tiene en cuenta la energía que se pierde como calor.

Cantidad de energía proveniente del alimento que dispone el animal para sus procesos metabólicos. Sustrayendo a la ED la energía perdida en los productos gaseosos de la digestión y la energía perdida en la orina, se obtiene la Energía Metabolizable (EM).

$$EM = ED - E_g - E_o$$

$$EM = E_c - E_h - E_g - E_o$$

1.3.3. ENERGÍA NETA (EN)

Energía neta es la fracción energética de un alimento que queda al deducir de la EB las pérdidas fecales, urinarias, gaseosas y calóricas. Por su mayor precisión, la energía neta se utiliza cada vez más en las fórmulas de las raciones, aunque cuesta más determinarla.

En la actualidad se utilizan dos sistemas para evaluar la energía neta. Lofgreen y Garrett desarrollaron un sistema en el cual se enumeran los requerimientos de energía neta de acuerdo con las funciones fisiológicas.

Aporte energético del alimento que efectivamente es utilizado por el animal. Parte de la EM que es retenida como productos (carne, leche, huevos, etc.) o utilizada en las funciones de mantenimiento del organismo.

$$EN = EM - IC$$

IC = Incremento en la producción de calor resultado de la ingestión de alimentos

Incluye calor proveniente de:

- Fermentaciones microbianas
- Trabajo: movimiento del TGI, acción de enzimas digestivas
- Metabolismo de nutrientes (mantenimiento y síntesis)
- Excreción de productos de desecho

1.3.3.1. ENERGÍA DE MANTENIMIENTO

La primera y más importante función de los alimentos es la de satisfacer las necesidades de mantenimiento.

Es la cantidad necesaria para mantener en situación de equilibrio energético a un individuo adulto no gestante, ni lactante es decir improductivo

Fracción de la EN consumida destinada a mantener el equilibrio energético del animal.

Comprende la energía destinada a:

- Metabolismo basal

- Termorregulación
- Actividad voluntaria del animal.

1.3.3.2. ENERGÍA DE GANANCIA DE PESO

Es la energía que se destina a la reproducción, lactancia, crecimiento y terminación Después que se han cubierto las necesidades energéticas de mantenimiento.

1.4. MÉTODO CENIZAS ACIDO INSOLUBLE

La medición de la digestibilidad de un ingrediente es bastante importante, pues en parte refleja el aprovechamiento del alimento. El realizar la medición de la digestibilidad implica cuantificar los nutrientes consumidos y las cantidades de esos nutrientes que se eliminan en las heces. Es importante que las excretas recolectadas representen en forma cuantitativa el residuo no digerido del alimento consumido.

Se han empleado muy diversos métodos para la recolección de excretas: por ejemplo, en el caso de omnívoros se pueden utilizar la recolección total de excretas, fístulas duodenales o sustancias denominadas marcadores. En el caso de los herbívoros, dado lo complicado y extenso de su aparato digestivo, es prácticamente imprescindible el empleo de marcadores.

Un marcador es una sustancia inerte (no reacciona con los alimentos) que además no se absorbe y puede ser recuperada y cuantificada del excremento. Las cenizas insolubles son un marcador de la digestibilidad, como se muestra en la Fotografía 4, sus características insolubles en ácido. (50)



Fotografía Nº 4. CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO

Para estudios de digestibilidad, el alimento se administra en las mismas cantidades diarias por períodos más o menos prolongados. Se deja transcurrir algunos días como período preliminar, para permitir la eliminación de cualquier material no digestible, existente en el tracto digestivo (debido a la dieta ingerida antes de la prueba) y se inicia la recolección de las excretas por un cierto tiempo. (50)

La duración de los períodos de recolección depende de la especie de que se trate por ejemplo: para los rumiantes se requieren períodos de recolección de heces más largos que para otras especies, lo anterior debido a las características anatómicas y fisiológicas de su aparato digestivo. En animales de estómago simple como el cerdo, la digestión y evacuación se efectúa en 24 horas, mientras que en los rumiantes que se alimentan con forrajes los últimos residuos se eliminan entre 150 a 200 horas después de su ingestión, pero aproximadamente el 95% se elimina dentro de las primeras 140 horas. (43)

Es común en cerdos y equinos, emplear períodos preliminares de recolección de heces de 4 y 6 días respectivamente y en rumiantes de 8 a 10 días. En general mientras más se extiende el tiempo de recolección, más precisos serán los resultados. Por todo lo anteriormente descrito, las pruebas de digestibilidad obviamente son laboriosas y requieren de mucho tiempo. Por esta razón se ha buscado durante muchos años un método más simple para valorar la digestibilidad. (33)

Uno de los métodos desarrollado hace tiempo, implica la evaluación de la digestibilidad de una manera indirecta, esto es usando una sustancia marcadora que se añade al alimento proporcionado al animal. La ventaja de este método es que permite medir la digestibilidad de un nutriente sin necesidad de medir ni el alimento ingerido, ni la cantidad de heces eliminadas. (39)

Un buen marcador debe reunir algunas características, entre las que destacan: ser no digerible, no absorbible, no tener actividad fisiológica o farmacológica en el aparato digestivo (debe ser inerte), debe pasar en forma uniforme por el aparato digestivo, y además no debe contener elementos que se estén investigando, debe ser recuperable y posible de cuantificar por un análisis químico lo más sencillo posible.

Entre los diversos marcadores que se han probado están sustancias como: carmín, disprosio, cerio radiactivo, óxido férrico, óxido crómico, sulfato de bario, hollín etcétera, debe señalarse que ningún marcador debe ser considerado como de precisión segura. (39)

Desde que se conoce la indigestibilidad de algunas sustancias naturales, presentes en algunos alimentos como la lignina y las cenizas insolubles en ácido, se ha propuesto a estas sustancias como marcadores, debido a que tienen como ventaja el de ser constituyentes naturales de los alimentos.

Estos marcadores se han usado principalmente en rumiantes, y cuando se han comparado los resultados obtenidos, usando marcadores contra aquellos obtenidos midiendo la cantidad total ingerida y la cantidad total de excretas, se ha observado que existe una correlación estrecha entre ambas técnicas. (39)

1.4.1. Determinación de las cenizas insolubles en ácido.

Las cenizas insolubles en ácido (CIA), se hallan formadas por minerales no digestibles como el sílice, o bien por minerales que se encuentran formando compuestos muy estables (quelatos), que no pueden ser liberados por el medio predominante en el aparato digestivo. Por la razón anterior, para estimar la digestibilidad de ciertos alimentos “in

vivo”, se mide el contenido de CIA que existe en el alimento, así como en las heces de los animales del experimento que consumen ese alimento. (43)

$$\% \text{ de CIA} = \frac{\text{peso del crisol con cenizas} - \text{peso del crisol}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

1.5. MÉTODO DE RECOLECCIÓN TOTAL

El Método de Colección Total de Heces

La colección total de heces (CTH) es el método más confiable para medir digestibilidad, ya que involucra directamente factores tanto del alimento como del animal. Este método incluye la medición de la ingestión de una determinada ración de composición conocida y la colecta total de la excreción fecal correspondiente al alimento consumido. Las muestras del material ofrecido, al igual que las del rechazado, cuando se proporciona alimento *ad libitum*, muestras de orina y las heces, son analizadas en el laboratorio, para controlar el balance de nutrientes ingeridos y excretados, como base de la determinación de la digestibilidad de los nutrientes en estudio. Esta es normalmente representada por un coeficiente de digestibilidad, expresado en forma porcentual que se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Coeficiente de digestibilidad (\%)} = \frac{[\text{NI} - \text{NH}]}{\text{NI}} \times 100$$

Donde:

NI = Nutriente ingerido

NH = Nutriente en heces

Sin embargo, esta técnica posee algunas limitaciones con relación a la precisión de la estimación del coeficiente de digestibilidad, representadas principalmente por las pérdidas de metano por medio del eructo, producto de la fermentación ruminal de los

carbohidratos, el cual se considera digerido y los coeficientes de digestión determinados por diferencia entre los nutrientes ingeridos y los excretados, no siempre reflejan su disponibilidad. (31)

Alcanzar esta información a través de ensayos que involucren el CTH presenta una serie de desventajas desde el punto de vista práctico: es laborioso; requiere de la disponibilidad de jaulas de colección; de personal adiestrado en su manejo; el costo de mantenimiento de los animales y la imposibilidad de utilizar hembras en los ensayos.

El trabajo operativo del método de CTH, implica la medición diaria de consumo, la colección de heces una o dos veces al día, sin contaminarlas con la orina, mantener los arneses en su sitio y la colección de la orina. En ensayos a pastoreo la situación se complica aún más ya que los animales deben estar adaptados al uso de arneses y al constante manipuleo, pudiendo causar un efecto detrimental sobre los hábitos de pastoreo del animal. Todo esto ha promovido el uso creciente de marcadores en los estudios de digestión. (44)

1.6. ALIMENTOS

Los alimentos procesados son producidos dentro de límites de los estándares prescritos por los fabricantes, establecidos también para cumplir con requisitos legales y con otros reconocidos como convenientes. Esto se logra mediante la estandarización del proceso, tanto como sea posible en cada una de las siguientes etapas: en la granja, la materia prima, el proceso mismo y finalmente el producto elaborado, su empaque (*ver fotografía N° 5*) y su almacenamiento. (15)



Fotografía Nº 5. ALIMENTO BALANCEADO

Se puede definir a la alimentación animal como la disciplina de la producción animal encargada de estudiar la clase o tipos de alimentos consumidos por los animales, así como la proporción, preparación, presentación y racionamiento de estos. Se denomina ración al conjunto de alimentos que proporcionan los nutrientes para cubrir las necesidades del animal y que son ingeridos durante 24 hs. (18)

Los alimentos balanceados son formulados de acuerdo a las necesidades de cada especie que se ofrece a los animales en las cantidades que necesiten para cubrir sus necesidades de mantenimiento y producción. La Nutrición animal es la ciencia que estudia las necesidades en nutrientes de cada animal concreto y establece los alimentos más convenientes para satisfacerlas, una vez conocidos su composición en nutrientes y el metabolismo de estos en el animal. (21)

Alimentos son los productos naturales y artificiales que ingieren los animales para: 1) mantenerlos, 2) acrecentar la producción y rendimiento, incluyendo aquellos ingredientes que se utilizan para impartir sabor, dar color y reducir el estrés, o mejorar la palatabilidad, proveer volumen o preservar el alimento. Un alimento es digerido por el animal en el aparato digestivo y le proporciona uno o varios nutrientes, o elementos simples capaces de ser absorbidos por la mucosa del tubo digestivo, los cuales son metabolizados y utilizados por el animal para satisfacer sus necesidades de mantenimiento y producción.

Los alimentos están constituidos por:

- Agua
- Materia seca, que a su vez está constituida por
 - * Materia Inorgánica: Minerales
 - * Materia Orgánica:
 - Carbohidratos
 - Lípidos
 - Proteínas (prótidos)

- Ácidos nucleicos
- Ácidos orgánicos
- Vitaminas

Los alimentos pueden ser clasificados o agrupados de acuerdo a diferentes criterios:

* Origen: vegetal, animal, microbianos, marino, petroquímico (fosfato, carbonato, etc.), sintéticos (aminoácidos, vitaminas, urea, etc.)

* Composición química y características.

* Contenido de principios nutritivos y valor nutritivo de estos, expresados en energía y proteína utilizable, por determinadas especies o producciones animales. (21)

1.6.1. MUESTREO

El valor de los resultados de un análisis químico sobre una muestra de laboratorio bien preparada dependerá de que tan representativa sea la muestra del lote, serie, paquete o consignación de un alimento en particular del cual fue tomada y de la clase de información química que se necesita. Los productos comestibles y los ingredientes de alimentos son materiales en realidad heterogéneos, por lo que es difícil obtener una sola muestra absolutamente representativa para el análisis de laboratorio.

El problema puede ser disminuido seleccionando, ya sea al azar o en forma planeada, varias muestras del lote. Estas muestras pueden ser analizadas individualmente para obtener resultados de los cuales puede calcularse la composición media del lote o en ciertos casos las muestras se mezclan para dar una sola, que es representativa, de la cual se toma una muestra para el análisis de laboratorio, como se ve en la fotografía N° 6. (19)



Fotografía Nº 6. TOMA DE MUESTRA DE ALIMENTO BALANCEADO.

El proceso de muestreo es una de las facetas de la estadística y la mayor parte de las obras sobre estadística incluyen capítulos que describen los principios matemáticos elementales involucrados. Debido a las dificultades prácticas y a los aspectos económicos de un muestreo completamente estadístico y la variación natural en la composición de los productos alimenticios, el análisis de alimentos a menudo se efectúa sobre muestras escogidas al azar. (21)

1.6.1.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

A fin de obtener resultados analíticos precisos, la muestra de laboratorio debe ser tan homogénea como sea posible dentro de los límites del método analítico usado, para que los análisis duplicados coincidan lo más posible. El método de homogeneización dependerá del tipo de alimento que se está analizando. Se dispone de varios aparatos electromecánicos para reducir el tamaño de partículas de los alimentos y para mezclar íntimamente los productos alimentarios. Los picadores de carne, ralladores, mezcladores, homogeneizadores para alimentos secos, húmedos o mojados y los variados tipos de molinos para polvos, son piezas indispensables del equipo de un laboratorio alimentario. Todos los instrumentos mecánicos producen calor, por lo que se tendrá sumo cuidado de no alterar la composición de la muestra, por la pérdida de humedad debida al sobrecalentamiento del equipo. Los alimentos secos necesitan reducirse a polvo grueso

por medio de un molino mecánico y después mezclarse íntimamente con una cuchara o espátula.

Los alimentos sólidos húmedos, por ejemplo, los productos cárnicos, son homogeneizados mejor moliéndolos que picándolos, como se muestra en la Fotografía 7, donde las muestras atravesaron un proceso de molienda. Los alimentos fluidos son emulsionados mejor en una licuadora. Los aceites y grasas son preparados con facilidad por calentamiento suave y mezclado. (15)



Fotografía Nº 7. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS.

1.6.2. ANÁLISIS PROXIMAL

1.6.2.1. HUMEDAD

El agua se encuentra en los alimentos en tres formas: como agua de combinación, como agua adsorbida y en forma libre, aumentando el volumen. El agua de combinación está unida en alguna forma química como agua de cristalización o como hidratos. El agua adsorbida está asociada físicamente como una monocapa sobre la superficie de los constituyentes de los alimentos. El agua libre es aquella que es fundamentalmente un constituyente separado, con facilidad se pierde por evaporación o por secado. Dado que la mayor parte de los alimentos son mezclas heterogéneas de varias sustancias, pueden contener cantidades variables de agua de los tres tipos. (17)

Determinación de la humedad

Hay muchos métodos para la determinación del contenido de humedad de los alimentos, variando en su complicación de acuerdo a los tres tipos de agua y a menudo hay una correlación pobre entre los resultados obtenidos. Sin embargo, la generalidad de los métodos da resultados reproducibles, si las instrucciones empíricas se siguen con fidelidad y pueden ser satisfactorios para uso práctico. Los métodos pueden ser clasificados como por secado, destilación, por métodos químicos e instrumentales, del cual el más representativo es el método por secado.

En la fabricación de alimentos se pueden utilizar procedimientos rápidos para determinar humedad usando estufas desecadoras especiales que trabajan a temperaturas altas. Otras estufas tienen lámparas secadoras de radiación infrarroja y tienen además una balanza de lectura directa. Los hornos de microondas pueden utilizarse para la determinación de humedad en el laboratorio en forma rápida. (19)

1.6.2.2. PROTEÍNAS Y SU NECESIDAD

Entre todos los compuestos químicos, las proteínas deben considerarse ciertamente como los más importantes, puesto que son las sustancias de la vida.

Las proteínas constituyen gran parte del cuerpo animal; lo mantienen como unidad y lo hacen funcionar. Se las encuentra en toda célula viva. Ellas son el material principal de la

piel, los músculos, tendones, nervios y la sangre; de enzimas, anticuerpos y muchas hormonas. (17)

Las proteínas son polímeros grandes, son poliamidas y los monómeros de los cuales derivan son los ácidos a -aminocarboxílicos. Una sola molécula proteínica contiene cientos, e incluso miles, de unidades de aminoácidos, las que pueden ser de unos 20 tipos diferentes. El número de combinaciones diferentes, es decir, el número de moléculas proteínicas distintas que pueden existir, es casi infinito. Es probable que se necesiten decenas de miles de proteínas diferentes para formar y hacer funcionar un organismo animal; este conjunto de proteínas no es idéntico al que constituye un animal de tipo distinto. (22)

Las proteínas son necesarias para la formación y renovación de los tejidos. Los organismos que están en período de crecimiento necesitan un adecuado suministro de proteínas para su aumento de peso. Los organismos adultos que tienen su peso estabilizado están en equilibrio dinámico, en el que sus proteínas se degradan y se regeneran continuamente, aunque su composición permanece constante. Para ello debe existir en la dieta un suministro regular y continuo de proteínas. (17)

1.6.2.3. GRASA

Los cuerpos grasos o lípidos son mezclas de esteres resultantes de la combinación de glicerina con los ácidos grasos superiores, principalmente el palmítico, oleico y esteárico. Son pocos los cuerpos grasos en cuya composición intervienen, en cantidad considerable, los ácidos grasos inferiores.

Los lípidos son insolubles en el agua y menos densos que ella. Se disuelven bien en disolventes no polares, tales como el éter sulfúrico, sulfuro de carbono, benceno, cloroformo y en los derivados líquidos del petróleo. Se encuentran lípidos, tanto en vegetales como en los animales. Muchos vegetales acumulan considerables cantidades de lípidos en los frutos y semillas. Los animales tienen grasa en las diferentes partes de su cuerpo, especialmente entre la piel y los músculos, en la médula de los huesos y alrededor de las vísceras. (19)

Hay lípidos sólidos, denominados grasas, y líquidos denominados aceites. El término grasa se emplea para aquellas mezclas que son sólidas o semisólidas a temperatura ambiente, en tanto que el término aceite se aplica a mezclas que son líquidas a temperatura ambiente.

Existen diferentes familias o clases de lípidos, pero las propiedades distintivas de todos ellos derivan de la naturaleza hidrocarbonada de la porción principal de su estructura.

Los lípidos desempeñan diversas funciones biológicas importantes, actuando:

- 1) Como componentes estructurales de las membranas,
- 2) Como formas de transporte y almacenamiento del combustible catabólico,
- 3) Como cubierta protectora sobre la superficie de muchos organismos, y
- 4) Como componentes de la superficie celular relacionados con el reconocimiento de las células, la especificidad de especie y la inmunidad de los tejidos.

Algunas sustancias clasificadas entre los lípidos poseen una intensa actividad biológica: se encuentran entre ellas algunas de las vitaminas y hormonas.

Aunque los lípidos constituyen una clase bien definida de biomoléculas, veremos que con frecuencia se encuentran combinados covalentemente o mediante enlaces débiles, con miembros de otras clases de biomoléculas, constituyendo moléculas híbridas tales como los glucolípidos, que contienen lípidos y glúcidos, y las lipoproteínas que contienen lípidos y proteínas. En estas biomoléculas las propiedades químicas y físicas características de sus componentes están fusionadas para cumplir funciones biológicas especializadas. (15)

1.6.2.4. FIBRA CRUDA

Es el residuo orgánico combustible e insoluble que queda después de que la muestra se ha tratado en condiciones determinadas. Las condiciones más comunes son tratamientos sucesivos con petróleo ligero, ácido sulfúrico diluido hirviente, hidróxido de sodio

diluido hirviente, ácido clorhídrico diluido, alcohol y éter. Este tratamiento empírico proporciona la fibra cruda que consiste principalmente del contenido en celulosa además de la lignina y hemicelulosas contenidas en la muestra. Las cantidades de estas sustancias en la fibra cruda pueden variar con las condiciones que se emplean, por lo que para obtener resultados consistentes deben seguirse procedimientos estandarizados con rigidez.

La fibra debería considerarse como una unidad biológica y no como una unidad química. La pared celular de las plantas tiene una estructura compleja compuesta de celulosa y hemicelulosa, pectina, algo de proteína, sustancias nitrogenadas lignificadas, ceras, cutina y componentes minerales. Este material se divide a su vez en sustancias insolubles de la matriz, que incluyen la lignina, celulosa y hemicelulosa, y las más solubles como la pectina, ceras y proteína, que se pueda extraer.

La fibra también le da las propiedades físicas a los alimentos, y generalmente baja la densidad calórica de los alimentos.

Fibra Bruta también se la denomina Fibra Cruda y pretende ser un estimador de los CH estructurales. Se determina mediante la extracción con éter y con hidrólisis con ácido sulfúrico e hidróxido de Na, pretendiendo simular una digestión ácida (estómago) y una alcalina (intestino), por lo cual representaría la fracción indigestible de los CH. En la fotografía N° 8 se muestra el equipo para determinar fibra cruda a través de la digestión ácido-básica.



Fotografía N° 8. EQUIPO DE FIBRA CRUDA.

1.6.2.5. CENIZAS TOTALES

Se denomina así a la materia inorgánica que forma parte constituyente de los alimentos (sales minerales). Las cenizas permanecen como residuo luego de la calcinación de la materia orgánica del alimento. La calcinación debe efectuarse a una temperatura adecuada, que sea lo suficientemente alta como para que la materia orgánica se destruya totalmente, a través de una mufla, (*ver fotografía N° 9*), pero tenemos que observar que la temperatura no sea excesiva para evitar que los compuestos inorgánicos sufran alteración.



Fotografía N° 9. MUFLA TERMO REGULABLE.

Todos los alimentos contienen elementos minerales formando parte de los compuestos orgánicos e inorgánicos. Es muy difícil determinarlos tal y como se presentan en los alimentos, la incineración pasa a destruir toda la materia orgánica, cambia su naturaleza, las sales metálicas de los ácidos orgánicos se convierten en óxidos o carbonatos, o reaccionan durante la incineración para formar fosfatos, sulfatos o haluros. Algunos elementos como el azufre y los halógenos pueden no ser completamente retenidos en las cenizas, pudiéndose volatilizar.

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Bromatología del Sistema de Aseguramiento de Calidad de la Procesadora Nacional de Alimentos C.A. PRONACA-QUEVEDO, así como en la Granja Experimental de la Procesadora Nacional de Alimentos C.A. PRONACA-QUEVEDO.

2.1.1. UBICACIÓN

TABLA N° 5. LUGAR DE REALIZACIÓN Y APLICACIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.

Provincia:	Los Ríos
Cantón:	Quevedo
Parroquia:	Buena Fe
Lugar:	Procesadora Nacional de Alimentos C.A.

FUENTE: INSTITUTO GEOGRÁFICO MILITAR DEL ECUADOR

2.2. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Cuatro Cerdos de la especie genética PIC procedentes de la granja Afortunados, perteneciente al Departamento de Nutrición e Investigación de la Procesadora Nacional de Alimentos C.A. PRONACA-QUEVEDO.

2.2.2. MATERIA PRIMA

La investigación se realiza con heces muestreadas directamente de la excreción de los cerdos especie genética PIC, y alimento balanceado suministrado acorde a la edad del animal (Cerdos Desarrollo 2).

2.2.3. MATERIALES

- * Alambre
- * Balones aforados de 500 y 1000 mL
- * Bandeja metálica
- * Bandejas plásticas
- * Bureta de 50 ml
- * Cajas de aluminio
- * Crisoles de porcelana
- * Embudo (percolador)
- * Embudo plástico
- * Erlenmeyer de 250 ml
- * Etiquetas

- * Frascos
- * Fundas siplox
- * Guantes de nitrilo
- * Guantes térmicos
- * Jaulas metabólicas
- * Mascarillas
- * Papel filtro libre de cenizas
- * Pera de succión
- * Piceta
- * Pinza metálica
- * Pinza para crisoles
- * Pipetas volumétricas de 1ml, 10 ml, 25 ml
- * Probetas 50 mL y 100 mL
- * Quitasato
- * Recipientes plásticas
- * Soporte Universal
- * Vasos de precipitación de 50 mL
- * Vasos de precipitación de 600 mL sin pico

2.2.4. EQUIPOS Y ACCESORIOS

- * Balanza analítica con sensibilidad 0.1 mg,
- * Estufa termo regulable
- * Desecador provisto de sustancia desecante
- * Placa de calentamiento
- * Mufla termo regulable
- * Extractor de vapores
- * Bomba calorimétrica
- * Refrigeradora-congeladora
- * Termómetro digital
- * Bomba de vacío

- * Cronómetro
- * Equipos de protección

2.2.5. REACTIVOS

- * Ácido Clorhídrico concentrado p.a.
- * Nitrato de Plata
- * Carbonato de Sodio
- * Rojo de Metilo
- * Agua Destilada
- * Oxígeno

2.3. MÉTODOS

- Determinación de Humedad por pérdida de secado: **NA-AC15-M01**
- Determinación de Energía bruta: **NA-AC15-M36**
- Método Cenizas Insolubles en Ácido Alternativa₁ (**SHRIVASTAVA AND TALAPATRA -1962**).
- Método Cenizas Insolubles en Ácido Alternativa₂ (**VOGTMANN-1975**).
- Método Cenizas Insolubles en Ácido Alternativa₃ (**J. VAN KEULEN AND YOUNG-1977**)
- Método de Recolección Total de heces.

2.4. UNIDAD EXPERIMENTAL

Se utilizara un promedio de 300 g de Heces de cada uno de los cuatro animales de experimentación (Cerdos genética Pic) y 100 g de Alimento Balanceado Cerdos Desarrollo 2 (PROCERDOS-PRONACA) de cada uno de los cuatro cerdos utilizados para el trabajo de investigación.

Se realizara un análisis de varianza para los resultados de Digestibilidad de las tres alternativas del método Cenizas Ácido Insolubles y el método de Recolección Total, además la respectiva prueba de Tuckey.

Los parámetros de validación entre las tres alternativas del método Cenizas ácido Insolubles y el método de Recolección Total, se compararan descriptivamente con gráficos estadísticos.

2.5. MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

El presente trabajo busca comparar las tres alternativas (A₁-Shrivastava and Talapatra 1962; A₂-Vogtmann 1975; A₃-J. Van Keulen and Young 1977), con el método de referencia aplicado en la empresa (Recolección Total de heces).

La comparación se basara en al análisis tanto al alimento como a las muestras de heces fecales.

Las determinaciones a ejecutarse en las alternativas del método Cenizas Ácido Insolubles y en el Método de Recolección Total serán: Digestibilidad, y los cinco parámetros de validación (Incertidumbre de los resultados, Exactitud, Repetibilidad, Límite de detección, Especificidad).

Las tres alternativas a comparar se ejecutaran con las condiciones siguientes:

TABLA N°6 CONDICIONES DE ANÁLISIS DE LA ALTERNATIVA 1 DEL MÉTODO DE CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLES.

ALTERNATIVAS MÉTODO CIA	MUESTRA	CONDICIONES
ALTERNATIVA 1 (Shrivastava and Talapatra -1962)	ALIMENTO	Peso de muestra: 10 g de Alimento. Pre-incinerado: realizado en mufla por 5 horas a 650°C. Tratar con 15 mL de HCl concentrado, por 15 min. Incinerado durante 12 h a 650°C en una mufla.
	HECES FECALES	Peso de muestra: 20 g de Heces. Pre-incinerado: realizado en mufla por 5 horas a 650°C.

	Tratar con 15 mL de HCl concentrado, por 15 min. Incinerado durante 12 h a 650°C en una mufla.
--	---

FUENTE: EVALUATION OF ACID-INSOLUBLE ASH AS A NATURAL MARKER IN RUMINANT DIGESTIBILITY STUDIES. JOURNAL ANIMAL SCIENCE.

TABLA N°7 CONDICIONES DE ANÁLISIS DE LA ALTERNATIVA 2 DEL MÉTODO DE CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLES.

ALTERNATIVAS MÉTODO CIA	MUESTRA	CONDICIONES
ALTERNATIVA 2 (Vogtmann-1975)	ALIMENTO	Peso de muestra: 10 g de Alimento. Pre-incinerado: No Existe Tratar con 100 mL de HCl 4N, por 30 min. Incinerado durante 12 h a 650°C en una mufla.
	HECES FECALES	Peso de muestra: 10 g de Heces. Pre-incinerado: No Existe Tratar con 100 mL de HCl 4N, por 30 min. Incinerado durante 12 h a 650°C en una mufla.

FUENTE: EVALUATION OF ACID-INSOLUBLE ASH AS A NATURAL MARKER IN RUMINANT DIGESTIBILITY STUDIES. JOURNAL ANIMAL SCIENCE.

TABLA N°8 CONDICIONES DE ANÁLISIS DE LA ALTERNATIVA 3 DEL MÉTODO DE CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLES.

ALTERNATIVAS MÉTODO CIA	MUESTRA	CONDICIONES
ALTERNATIVA 3 (J. Van Keulen and Young-1977)	ALIMENTO	Peso de muestra: 5 g de Alimento. Pre-incinerado: realizado por 12 h a 450°C en la mufla Tratar con 100 mL de HCl 2N, por 5 min. Incinerado durante 12 h a 450°C en una mufla.
	HECES FECALES	Peso de muestra: 5 g de Heces.

	Pre-incinerado: realizado por 12 h a 450°C en la mufla Tratar con 100 mL de HCl 2N, por 5 min. Incinerado durante 12 h a 450°C en una mufla
--	---

FUENTE: EVALUATION OF ACID-INSOLUBLE ASH AS A NATURAL MARKER IN RUMINANT DIGESTIBILITY STUDIES. JOURNAL ANIMAL SCIENCE.

TABLA N°9 CONDICIONES DE ANÁLISIS DEL MÉTODO DE RECOLECCIÓN TOTAL.

ALTERNATIVA	MUESTRA	CONDICIONES
MÉTODO DE RECOLECCIÓN TOTAL DE HECES	ALIMENTO	Peso del Alimento ingerido por el animal Determinación de Nutriente (Energía Bruta) en el alimento
	HECES FECALES	Peso de las Heces excretadas por el animal. Determinación de Nutriente (Energía Bruta) en las heces.

FUENTE: EVALUATION OF ACID-INSOLUBLE ASH AS A NATURAL MARKER IN RUMINANT DIGESTIBILITY STUDIES. JOURNAL ANIMAL SCIENCE.

En las tres alternativas del método Cenizas Ácido Insolubles y el método de Recolección Total, se usan las mismas muestras.

En lo referente al material biológico, preparación de muestras de alimento balanceado, muestras de heces, Alternativas del método Cenizas ácido Insolubles y método de Recolección Total, se detallan en los siguientes numerales:

2.5.1. METODOLOGÍA DE PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

Se utiliza 12 cerdos masculinos raza Genética PIC, castrados con un peso promedio de 9 a 15 kg., alojados individualmente en jaulas de metabólicas, con comedero y bebedero. Al inicio del experimento son vacunados y desparasitados. Los animales se pesan al inicio y al final de la prueba (60 días), en la fotografía N° 10 podemos observar el alojamiento de los animales de experimentación. Para el tratamiento los animales se

distribuyen conforme a un diseño completamente al azar, quedando cuatro animales para el análisis. En la dieta experimental que se utiliza alimento balanceado según requerimientos a la edad de inicio (cerdos desarrollo 2).



FOTOGRAFÍA N° 10. ALOJAMIENTO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. GALPÓN EXPERIMENTAL PRONACA QUEVEDO.

2.5.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTO BALANCEADO

En las muestras de alimento previa la aplicación del método de cenizas ácido insolubles se determina la humedad de acuerdo al método de análisis **NA-AC15-M01**.

El alimento seco se guarda en fundas herméticas para evitar el contacto con el aire. Se determina el nutriente del alimento, Energía Bruta, de acuerdo al método de análisis **NA-AC15-M36**.

2.5.3. PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE HECES

Las muestras de heces son tomadas evitando contaminación con tierra o con cualquier otro tipo de material que afecten los resultados de los análisis, como se observa en la fotografía N° 11.



FOTOGRAFÍA N° 11. OBTENCIÓN DE MUESTRA DE HECES FECALES. GALPÓN EXPERIMENTAL PRONACA QUEVEDO.

Se toman aproximadamente 150 g de heces por día por un lapso de 5 días, en la fotografía N° 12 se indica la utilización de una balanza semi analítica para el peso diario, toda la materia obtenida se homogeniza, se procede a determinar su humedad y es almacenada seca para su posterior análisis.



FOTOGRAFÍA N° 12. BALANZA SEMI ANALÍTICA UTILIZADA PARA PESAR MUESTRAS DIARIAS DE MATERIA FECAL

Para la Determinación de humedad de heces, se realiza bajo condiciones estables en el laboratorio. Se pesan 20 g de muestra de heces dentro de cápsulas de aluminio. Las cápsulas deben estar perfectamente identificadas, y ordenadas de acuerdo a las muestras, se coloca la cápsula dentro de la Balanza analítica con sensibilidad 0.1 mg y se anota el peso de esta, se tara el equipo (encerar) y con la ayuda de una espátula se coloca la materia fecal dentro de la cápsula. Se anota el peso de la muestra y se retira del equipo de

pesaje. Las muestras fecales se introducen en una Estufa termo regulable, como se muestra en la Fotografía N° 13, a una temperatura de 68 °C y por un periodo de 15 horas.



**FOTOGRAFÍA N° 13. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN MATERIA FECAL.
LABORATORIO BROMATOLÓGICO PRONACA QUEVEDO**

Una vez transcurrido el tiempo de secado, se coloca las muestras en un desecador con material deshidratante adecuado por 15 minutos. La materia seca es pesada, y se calcula el porcentaje de humedad.

Calculo:

$$\% \text{Humedad} = \frac{(\text{Peso final cajamuestra} - \text{Peso caja vacía}) - \text{Peso muestra}}{\text{Peso muestra}} \times 100$$

Se almacenan las muestras secas en fundas herméticas, para prevenir el ingreso de humedad, y se colocan en un refrigerador a 6 °C, para su posterior análisis, el diagrama de flujo de la determinación de humedad en heces se muestra en la Figura N° 3.

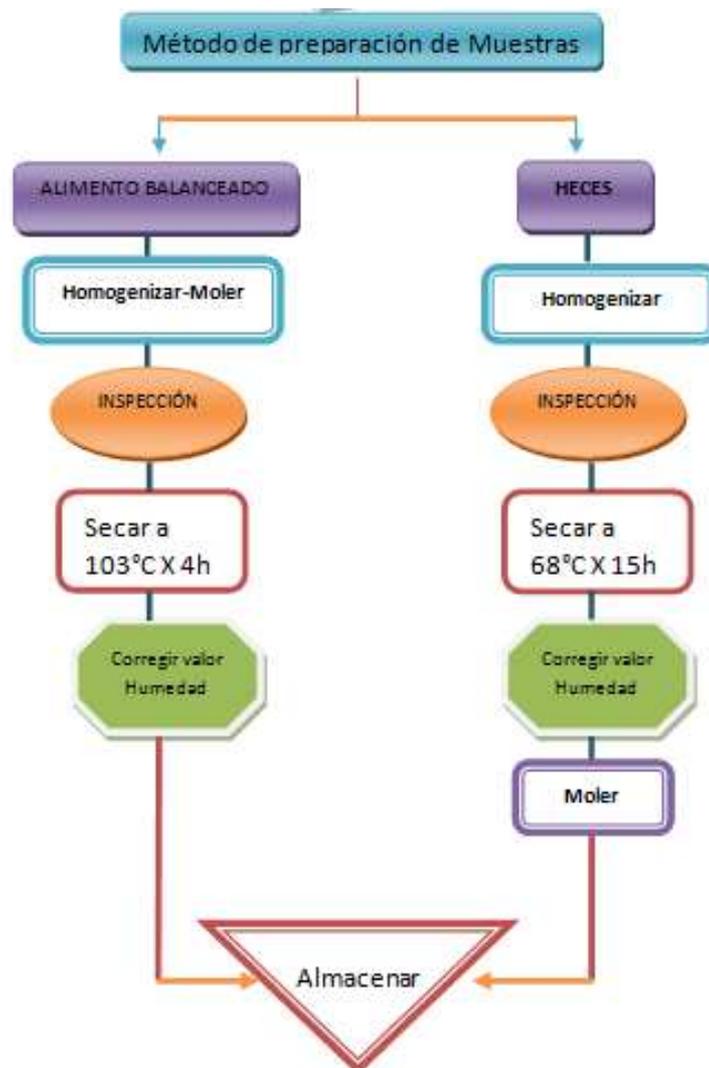


FIGURA N°3. ESQUEMA DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS

2.5.4. ALTERNATIVAS PARA DETERMINAR CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLES.

2.5.4.1. Alternativa 1 (Shrivastava and Talapatra -1962).

Método cenizas ácido insolubles, HCl concentrado.

La Determinación de Ceniza Insoluble en Acido aplicada por los autores Shrivastava y Talapatra (1962), utilizando principalmente Ácido Clorhídrico concentrado, no fue descrito totalmente en la publicación original pero se interpretó y se utiliza de la siguiente manera:

Se prepara previamente la muestra de heces seca y de alimento seco, se toma un peso de 10 g de alimento y 20 g de excremento en una Balanza analítica con sensibilidad 0.1 mg. Se coloca la muestra en un crisol de porcelana ancho de 50 mL y se lleva a una mufla termo regulable, por encima de un periodo de 5 horas, aumentando la temperatura progresivamente de 250 a 650 °C, en incrementos de 100 °C. (Véase fotografía N° 14)



FOTOGRAFÍA N° 14. PRE-INCINERACIÓN DE MUESTRAS. CIA ALT.1. LABORATORIO BROMATOLÓGICO PRONACA QUEVEDO

La ceniza resultante se humedece con 5 ml de agua, después de esto se agrega 10 mL de HCl concentrado (11-12 N), la mezcla se evapora a sequedad encima de una plancha caliente, esto es repetido por dos veces.

Posteriormente se agrega 5 mililitros de HCl concentrado y se deja durante de 15 min encima de la plancha caliente. El contenido de los crisoles se filtra (Whatman No. 41), a través de papel filtro libre de cenizas.

La ceniza se lava con agua destilada caliente (85 a 100 °C), con el fin de dejarla libre del ácido, la ceniza y el papel filtro se transfirieren a un crisol, y se introducen a la mufla durante 12 horas a 650 °C. El crisol se refresca en un desecador para regular la temperatura, se pesa el contenido de ceniza. (40)

2.5.4.2. Alternativa 2. (Vogtmann-1975)

Método cenizas ácido insolubles, HCl 4N.

En la Alternativa 2 de acuerdo con el autor Vogtmann-1975, la determinación de Cenizas Ácido Insolubles se describe de la siguiente manera:

Se toma un peso de 10 g de muestra seca tanto de alimento como de heces, se pesa en una Balanza analítica con sensibilidad 0.1 mg en un Erlenmeyer de 250 mL, se le agrega 100 mL de HCl 4N. La mezcla es hervida muy despacio por un período de 30 min en una plancha de calentamiento, junto con un extractor de vapor de aire. Un condensador se ata al frasco para prevenir pérdida de HCl.



FOTOGRAFÍA N° 15. TRATAMIENTO DE MUESTRA DIRECTO CON ÁCIDO. CIA ALT 2. LABORATORIO BROMATOLÓGICO PRONACA QUEVEDO

La mezcla caliente se filtra, utilizando papel filtro libre de ceniza (Whatman No. 41), se lava el filtrado para quedar libre del ácido con agua destilada caliente (85 a 100 C).

La ceniza junto con el papel filtro se transfirieron a un crisol de 50 mL previamente pesado, se coloca dentro de una mufla termo regulable durante 12 horas a 650 C.

Después el crisol junto con la ceniza se refresca en un desecador para regular la temperatura y se pesa. (40)

2.5.4.3. Alternativa 3. (J. Van Keulen and Young-1997)

Método cenizas ácido insolubles, HCl 2N.

La Alternativa 3 de acuerdo con los autores J. Van Keulen and Young-1997, la determinación de Cenizas Ácido Insolubles se describe de la siguiente manera:

Se toma 5 gramos de muestra de alimento seco y de heces secas, se pesa en un crisol de 50 mL en una Balanza analítica con sensibilidad 0.1 mg

Posteriormente se pesa la muestra y coloca está en una mufla durante 12 horas a 450 °C.

La ceniza se transfiere a una copa de Berzelius sin el pico (vaso de precipitación de 600 mL) agregamos 100 mL de HCl 2N, como se demuestra en la fotografía N° 16. La mezcla se hierve durante 5 min en un aparato de digestión de fibra cruda. Alternativamente se puede hervir a ebullición la mezcla en un plato de calentamiento.



FOTOGRAFÍA N° 16. MUESTRA TRATADA CON ÁCIDO CLORHÍDRICO 2N. CIA ALT 3. LABORATORIO BROMATOLÓGICO PRONACA QUEVEDO

La mezcla caliente se filtra utilizando papel filtro libre de cenizas (Whatman No. 41), esta se lava para quedar libre del ácido, se realiza con agua destilada caliente (85° a 100 ° C), como se observa en la Fotografía N° 17. El filtrado junto con el papel filtro se transfiere a un crisol, y se lo introduce en una mufla durante 12 horas a 450 °C. El crisol y el volumen se refrescan en un desecador para nivelar la temperatura, y se pesa. (40)



**FOTOGRAFÍA N° 17. FILTRACIÓN DE CENIZAS TRATADAS CON ÁCIDO. CIA ALT 3.
LABORATORIO BROMATOLÓGICO PRONACA QUEVEDO**

2.5.5. DETERMINACIÓN DE DIGESTIBILIDAD POR EL MÉTODO CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLES.

Una vez obtenido el valor del porcentaje de cenizas ácido insolubles (marcador indirecto) tanto en la muestra de alimento balanceado como en la de heces fecales, determinamos la digestibilidad aparente, para lo cual necesitamos medir el porcentaje de un nutriente en el alimento y en las heces. Los cuales podrían ser Extracto Etéreo, Fibra Bruta o Energía Bruta.

Esta es normalmente representada por digestibilidad, expresado en forma porcentual que se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Digestibilidad aparente \%} = 100 - [100 (MA/MH)(NH/NA)]$$

Donde:

MA =% de marcador en el alimento

MH =% de marcador en las heces

NH =% de nutriente en las heces

NA =% de nutriente en el alimento.

2.5.6. DETERMINACIÓN DE DIGESTIBILIDAD POR EL MÉTODO DE RECOLECCIÓN TOTAL

Este método incluye la medición de la ingestión de una determinada ración de composición conocida y la colecta total de la excreción fecal correspondiente al alimento consumido.

Está representada por un coeficiente de digestibilidad, expresado en forma porcentual que se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Coeficiente de digestibilidad (\%)} = [(NI - NH) / NI] \times 100$$

Donde:

NI = % Nutriente ingerido

NH = % Nutriente en heces

La determinación del nutriente en el alimento como en las heces es Energía Bruta de acuerdo al método **NA-AC15-M36**.

2.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS EN EL LABORATORIO

2.6.1. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD POR PÉRDIDA DE SECADO

Método **NA-AC15-M01**, adaptado en el Departamento de Aseguramiento de Calidad PRONACA-Quevedo.

FUNDAMENTO

Este método determina la pérdida de peso expresada como porcentaje de humedad de una muestra sometida al calor.

ALCANCE

Este método es aplicable a productos sólidos y semisólidos con excepción de aquellos que sometidos a temperaturas de 100 °C o mayores se descomponen.

DEFINICIONES

Pérdida por secado. Corresponde en su mayoría al contenido de agua libre de los productos y a pequeñas cantidades de otros compuestos volátiles.

MATERIALES Y EQUIPOS

- Plato de aluminio
- Desecador provisto de sustancia desecante
- Balanza analítica con precisión de 0.1 mg
- Estufa termo regulable

REACTIVOS

- NO Aplica.

PROCEDIMIENTO

- **Método 1. Temperatura 104 °C, tiempo de secado 3 horas**
 - Regular la estufa a 104 ± 2 °C
 - Colocar 3 gramos, exactamente pesados de muestra finamente molida y homogeneizada, en un plato de aluminio previamente tarado y pesado.
 - Colocar el plato en la estufa durante 3 horas (hasta peso constante).
 - Sacar el plato y enfriar en un desecador hasta temperatura ambiente.
 - Pesar y calcular la pérdida de peso y reportar como porcentaje de humedad.

- **Método 2. Temperatura 135 °C, tiempo de secado 2 horas**

- Regular la estufa a 135 ± 2 °C.
- Proceder de igual manera que en método 1, con la excepción que el tiempo de secado es de 2 horas.

CÁLCULOS

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{(P_i - P_f)}{P_i} \times 100$$

En donde:

P_i ; peso inicial en g. antes del calentamiento

= peso del recipiente más la muestra – peso del recipiente

P_f ; peso final en g. después del calentamiento

= peso del recipiente más la muestra seca – peso del recipiente

REFERENCIA DEL MÉTODO

Método 1. Método AOAC 935.29 modificado

Método 2. Método AOAC 930.15 modificado

2.6.2. DETERMINACIÓN DE ENERGÍA BRUTA

Método **NA-AC15-M36**, Método Oficial de ASTM 1974. Standards for bomb calorimetric and combustion methods. American Society for Testing Materials. Philadelphia, Pa, U.S.A., adaptado en el Departamento de Aseguramiento de Calidad PRONACA-Quevedo.

FUNDAMENTO

Este método sirve para determinar la energía bruta de una muestra sometida a ignición expresado en Kilocalorías / kilogramos.

ALCANCE

Este método es aplicable directamente a materias primas sólidas, semisólidas, aceites, productos terminados, heces secas y aquellos productos con altos contenidos de humedad deben ser previamente secados.

MATERIALES Y EQUIPOS

- Calorímetro
- Bomba calorimétrica
- Calentador de agua para el calorímetro
- Prensa para pastillado
- Tanque de oxígeno
- Balanza analítica con precisión de 0.1 mg
- Cápsulas de aluminio
- Pinzas
- Bureta
- Soporte universal
- Tijeras
- Regla

REACTIVOS

- Solución de Carbonato de sodio 0.072N. Pesar 3.84 g de Na_2CO_3 previamente deshidratado a 100°C por 2 horas y disolver en un litro de agua recientemente hervida y fría.
- Solución indicadora de naranja de metilo, al 0.1. Pesar 0.1g del indicador naranja de metilo, colocar en un balón de 100 ml y disolver con alcohol etílico.
- Ácido Benzoico RA, estándar para calorimetría: pastillas de ácido benzoico grado pa.
- Alambre de fusión de cromo níquel

PROCEDIMIENTO

- Moler la muestra en un molino con criba de 1mm.

- Preparar una pastilla en la prensa con una cantidad de muestra alrededor de 1 a 1.5 g.
- Pesar la pastilla preparada en la cápsula de aluminio, manejar siempre la cápsula con pinzas, nunca con las manos.
- Cortar máximo 14 cm del alambre de fusión y sujetarlos en los dos extremos del soporte de la tapa de la bomba calorimétrica doblándolos en forma de V para que tengan contacto con la muestra.
- Colocar la cápsula con la muestra en el soporte situado en la tapa de la bomba calorimétrica y ubicar el alambre de tal forma que haga contacto.
- Añadir 1 ml de agua dentro de la bomba calorimétrica, y cerrar la bomba teniendo cuidado de enroscar la tapa de una forma correcta.
- Revisar que la válvula que se utiliza para desfogar la presión esté cerrado y proceder a inyectar de 25 a 35 atmósferas de oxígeno.
- Situar la bomba dentro de la cubeta que contendrá exactamente 2 litros de agua destilada.
- Conectar los electrodos en la bomba calorimétrica indistintamente.
- Tapar el calorímetro y conectar el empaque del agitador hacia el motor que permite el movimiento del mismo. Encender el aparato para que trabajen los agitadores. Medir la temperatura del baño de la cubeta que contiene la bomba la cual no debe sobrepasar los 20 °C si esto ocurriera, se debe cambiar el agua del baño por una más fría. Registrar la temperatura de la cubeta (T_i) cuando se estabilice o no haya variación de $\pm 0.01^\circ\text{C}$.
- Presionar el botón rojo de ignición. La combustión de la muestra provocara un aumento en la temperatura del agua de la cubeta que contiene la bomba, aproximadamente 20 segundos después de la ignición. El incremento en la temperatura será rápido al principio y más lento a medida que se empieza a estabilizar. Después de que la temperatura de la cubeta se ha estabilizado alrededor de 5 min., lea y registre la temperatura final (T_f).
- Desconectar el empaque del agitador y abrir la tapa del calorímetro, desconectar los electrodos.
- Coger la bomba calorimétrica con guantes y colocarla dentro de un chorro de agua fría para bajar la temperatura de la misma.

- Girar la válvula para sacar la presión de oxígeno contenida en la bomba, cuando se haya liberado la presión desenrosque la tapa de la bomba y abra cuidadosamente.
- Lave dentro de la bomba, con un chorro de agua destilada de aproximadamente 150 ml, el interior de la bomba y la cápsula que contiene la muestra, recoger en un vaso de precipitación de 250ml los líquidos del lavado y agregar 4 gotas de indicador de naranja de metilo y titule con la solución de carbonato de sodio 0.0720N hasta viraje a color amarillo. Registre los ml consumidos en la titulación.
- Medir el alambre de fusión que no se quemó y que debe estar aún unido a los electrodos de la cápsula de la muestra, registre los centímetros del alambre residual.

CÁLCULOS

$$EB \text{ (Kcal/Kg)} = \frac{(w * \Delta t) - (e_1 + e_2)}{m}$$

En donde:

EB (cal/g.)	Energía bruta expresada en calorías/gramo
W	Valor estándar de energía en calorías/°C del ácido benzoico patrón
Δt	Diferencia Temperatura final – Temperatura inicial
e ₁	resultado de multiplicar el consumo de alambre en mm por el calor de combustión del alambre de fusión 0.23 cal/mm, si se usa el alambre de cromo níquel
e ₂	Mililitros de carbonato de sodio 0.072N
m	Peso de la muestra en gramos

CAPÍTULO III

3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

3.1. DETERMINACIÓN DEL ANÁLISIS DE VARIANZA.

TABLA N° 10. ANÁLISIS DE VARIANZA DEL COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD DE LAS TRES ALTERNATIVAS DEL MÉTODO CIA Y DEL MÉTODO RECOLECCIÓN TOTAL DE HECES.

Análisis de la Varianza (SC Tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	3479,38	3	1159,79	144,19	<0,0001
TRATAMIENTO	3479,38	3	1159,79	144,19	<0,0001
Error	353,92	44	8,04		
Total	3833,30	47			

FUENTE: INFODAT-RESULTADOS DE CUADROS N°6, N°7, N°8 Y N°9.

CUADRO N°1. PRUEBA DE TUCKEY AL 5% CON LOS COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDAD ENTRE EL MÉTODO DE RECOLECCIÓN TOTAL Y LAS DIFERENTES ALTERNATIVAS DEL MÉTODO CENIZAS ACIDO INSOLUBLE EN ALIMENTO BALANCEADO. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PROCESADORA NACIONAL DE ALIMENTOS CA. PRONACA. QUEVEDO. FEBRERO DEL 2010.

ALTERNATIVAS	COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD (%)	RANGO
CIA ALT1	68,68	A
CIA ALT3	87,07	B
CIA ALT2	88,2	B
RT	89,46	B

MEDIAS SEGUIDAS DE LA MISMA LETRA NO DIFIEREN ESTADÍSTICAMENTE.

Los resultados expresados en el cuadro N° 1, indica el análisis de varianza ($\alpha=0,05$) correspondiente a la determinación del coeficiente de digestibilidad, los cuales no presentan diferencias estadísticas entre el método de recolección total (tratamiento 1) y las alternativas 2 y 3 del Método de Cenizas Acido Insolubles.

Se comprueba que el método de Recolección total es comparable con el método de Cenizas Acido Insolubles alternativa 2 según Vogtmann-1975 HCl 2N, por su semejanza en los porcentajes de digestibilidad y su igualdad estadística.

3.2. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD EN ALIMENTO BALANCEADO CERDOS DESARROLLO 2

La determinación del porcentaje Humedad en alimento Balanceado Cerdos Desarrollo 2 se realizo para la obtención de muestra seca y para el desarrollo de los métodos de análisis, se determinó a través del método **NA-AC15-M01**.

Los resultados del porcentaje de Humedad se reportan en la tabla 2.

**CUADRO N°2. PORCENTAJE DE HUMEDAD EN ALIMENTO BALANCEADO CERDOS
DESARROLLO 2. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y
ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PRONACA. QUEVEDO. FEBRERO
DEL 2010.**

PRODUCTO	N°	HUMEDAD %
	CERDO	
CERDOS DESARROLLO 2	3A	11,87
CERDOS DESARROLLO 2	3A	11,60
CERDOS DESARROLLO 2	3A	11,71
CERDOS DESARROLLO 2	6A	11,59
CERDOS DESARROLLO 2	6A	11,42
CERDOS DESARROLLO 2	6A	11,58
CERDOS DESARROLLO 2	9A	11,63
CERDOS DESARROLLO 2	9A	11,66
CERDOS DESARROLLO 2	9A	11,63
CERDOS DESARROLLO 2	11A	11,88
CERDOS DESARROLLO 2	11A	11,85
CERDOS DESARROLLO 2	11A	11,87
	PROMEDIO	11,69

REALIZADO POR: JESSENIA KATHERINE BUNAY

Analizando los resultados expuestos en el cuadro N° 2, apreciamos que el porcentaje de Humedad del Alimento Balanceado CERDOS DESARROLLO 2, administrado a los animales de experimentación tiene una humedad promedio de 11,69%, dato necesario para obtener el porcentaje de digestibilidad en el Método de Recolección Total. El porcentaje de humedad obtenido se encuentra dentro de los parámetros adecuados y especificados en la ficha técnica T322R1BA, una humedad mayor a la especificada, provoca el calentamiento del alimento y la proliferación de hongos, tornando al alimento no apto para el consumo de los animales.

3.3. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD EN HECES DE CERDOS DE ALIMENTO BALANCEADO CERDOS DESARROLLO 2

La determinación del porcentaje de Humedad en Heces de animales cuando se les ha administrado Alimento Balanceado Cerdos Desarrollo 2 se realizo para la obtención de muestra seca y para el desarrollo de los métodos de análisis.

Los resultados del porcentaje de Humedad se reportan en la tabla 3.

CUADRO N° 3. PORCENTAJE DE HUMEDAD EN HECES DE CERDOS CUANDO INGIRIERON ALIMENTO BALANCEADO CERDOS DESARROLLO 2. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PROCESADORA NACIONAL DE ALIMENTOS CA. PRONACA. QUEVEDO. FEBRERO DEL 2010.

PRODUCTO	N° CERDO	HUMEDAD %
HECES CERDOS DESARROLLO 2	3A	61,66
HECES CERDOS DESARROLLO 2	3A	62,32
HECES CERDOS DESARROLLO 2	3A	61,98
HECES CERDOS DESARROLLO 2	6A	65,94
HECES CERDOS DESARROLLO 2	6A	66,31
HECES CERDOS DESARROLLO 2	6A	66,14
HECES CERDOS DESARROLLO 2	9A	61,76
HECES CERDOS DESARROLLO 2	9A	62,75
HECES CERDOS DESARROLLO 2	9A	62,27
HECES CERDOS DESARROLLO 2	11A	56,33
HECES CERDOS DESARROLLO 2	11A	60,21
HECES CERDOS DESARROLLO 2	11A	58,29
PROMEDIO		62,16

REALIZADO POR: JESSENIA KATHERINE BUÑAY

En los resultados expuestos en el cuadro N° 3, apreciamos que el porcentaje de Humedad promedio de Heces de cerdos, cuando se les administro Alimento Balanceado CERDOS DESARROLLO 2, es 62,16%, dato necesario para obtener el porcentaje de digestibilidad en el Método de Recolección

Total. Los porcentajes obtenidos de humedad en heces, nos indican que la digestión ha sido homogénea en los animales, el porcentaje de humedad en heces es equivalente (agua excretada) a la cantidad de agua ingerida por los animales.

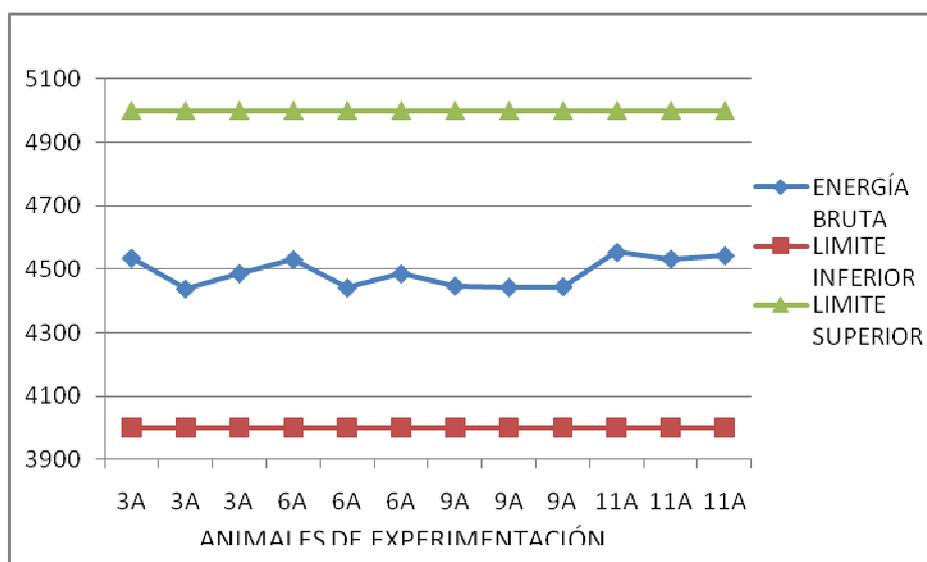
3.4. DETERMINACIÓN DE ENERGÍA BRUTA EN ALIMENTO BALANCEADO CERDOS DESARROLLO 2.

CUADRO N°4. ENERGÍA BRUTA EN ALIMENTO BALANCEADO CERDOS DESARROLLO 2. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PROCESADORA NACIONAL DE ALIMENTOS CA. PRONACA. QUEVEDO. FEBRERO DEL 2010.

<i>PRODUCTO</i>	<i>N°</i>	<i>ENERGÍA</i>
<i>ALIMENTO BALANCEADO</i>	<i>CERDO</i>	<i>Kcal / Kg</i>
CERDOS DESARROLLO 2	3 A	4535,99
CERDOS DESARROLLO 2	3 A	4437,82
CERDOS DESARROLLO 2	3 A	4486,92
CERDOS DESARROLLO 2	6 A	4530,89
CERDOS DESARROLLO 2	6 A	4441,11
CERDOS DESARROLLO 2	6 A	4486,02
CERDOS DESARROLLO 2	9 A	4447,02
CERDOS DESARROLLO 2	9 A	4442,63
CERDOS DESARROLLO 2	9 A	4444,83
CERDOS DESARROLLO 2	11 A	4554,23
CERDOS DESARROLLO 2	11 A	4533,17
CERDOS DESARROLLO 2	11 A	4543,72
PROMEDIO		4490,36

REALIZADO POR: JESSENIA KATHERINE BUÑAY

Los resultados expresados en el cuadro N° 4, indican la determinación de energía bruta en alimento balanceado Cerdos Desarrollo 2, energía liberada por la ruptura de los enlaces de productos orgánicos, siendo los hidratos de carbono y las grasas los nutrientes ingeridos por los animales los que proporcionan energía necesaria para trabajos celulares, el alimento balanceado presenta un promedio de 4490,36 Kcal/Kg de energía bruta, encontrándose dentro de las formulaciones esperadas.



REALIZADO POR: JESSENIA KATHERINE BUÑAY

GRÁFICO No. 1. DETERMINACIÓN DE ENERGÍA BRUTA EN ALIMENTO BALANCEADO CERDOS DESARROLLO 2 ADMINISTRADO A CUATRO ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PROCESADORA NACIONAL DE ALIMENTOS CA. PRONACA. QUEVEDO. FEBRERO DEL 2010.

En el gráfico 1, se presentan los datos obtenidos de la determinación de Energía Bruta, analizando los valores obtenidos evidenciamos que se encuentran dentro de los límites esperados para la alimentación de los animales,

estos intervendrán en la obtención de tejido magro en el animal con lo cual se califica su calidad.

3.5. DETERMINACIÓN DEL ENERGÍA BRUTA EN HECES DE CERDOS

CUADRO N°5. ENERGÍA BRUTA EN HECES DE CERDOS CUANDO SE LES ADMINISTRO ALIMENTO BALANCEADO CERDOS DESARROLLO 2. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PROCESADORA NACIONAL DE ALIMENTOS CA. PRONACA. QUEVEDO. FEBRERO DEL 2010.

PRODUCTO HECES FECALES	N° CERDO	ENERGÍA Kcal / K g
CERDOS DESARROLLO 2	3 A	4356,28
CERDOS DESARROLLO 2	3 A	4260,70
CERDOS DESARROLLO 2	3 A	4308,47
CERDOS DESARROLLO 2	6 A	4338,51
CERDOS DESARROLLO 2	6 A	4345,41
CERDOS DESARROLLO 2	6 A	4341,96
CERDOS DESARROLLO 2	9 A	4444,37
CERDOS DESARROLLO 2	9 A	4365,42
CERDOS DESARROLLO 2	9 A	4404,89
CERDOS DESARROLLO 2	11 A	4258,64
CERDOS DESARROLLO 2	11 A	4365,62
CERDOS DESARROLLO 2	11 A	4312,14
	PROMEDIO	4341,87

REALIZADO POR: JESSENIA KATHERINE BUÑAY

Los resultados expresados en el cuadro N° 5, indican la determinación de energía bruta en Heces de cerdos, cuando la energía entra al organismo parte se elimina por materia fecal, indicándose que porción fue absorbida y poder determinar la digestibilidad de los nutrientes del pienso, los datos obtenidos son utilizados para la obtención del coeficiente de digestibilidad de los métodos de recolección total y Cenizas Ácido Insolubles.

3.6. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD MEDIANTE EL MÉTODO DE RECOLECCIÓN TOTAL

CUADRO N°6. COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD MEDIANTE EL MÉTODO DE RECOLECCIÓN TOTAL EN ALIMENTO BALANCEADO CERDOS DESARROLLO 2. DURANTE CINCO DÍAS DE RECOLECCIÓN. EN CUATRO ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PROCESADORA NACIONAL DE ALIMENTOS CA. PRONACA. QUEVEDO. MARZO DEL 2010.

FECHA	N° DE CERDO	COEFICIENTE DIGESTIBILIDAD (%)
15-mar-10	3 A	90,94%
15-mar-10	3 A	91,12%
15-mar-10	3 A	91,03%
15-mar-10	6 A	89,94%
15-mar-10	6 A	89,85%
15-mar-10	6 A	89,89%
15-mar-10	9 A	86,03%
15-mar-10	9 A	86,62%
15-mar-10	9 A	86,33%
15-mar-10	11 A	90,23%
15-mar-10	11 A	90,84%
15-mar-10	11 A	90,53%
	PROMEDIO	89,45%

REALIZADO POR: JESSENIA KATHERINE BUNAY

Los resultados expresados en el cuadro N° 6, representan el porcentaje del coeficiente de digestibilidad en alimento balanceado cerdos desarrollo 2 aplicando el método de recolección total, el promedio de digestibilidad es de 89,45% indicando que los

nutrientes del alimento balanceado son aprovechados casi en su totalidad en cerdos de Genética PIC.

3.7. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD MEDIANTE EL MÉTODO CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLES. ALTERNATIVA 1 (SHRIVASTAVA AND TALAPATRA -1962) HCl CONCENTRADO.

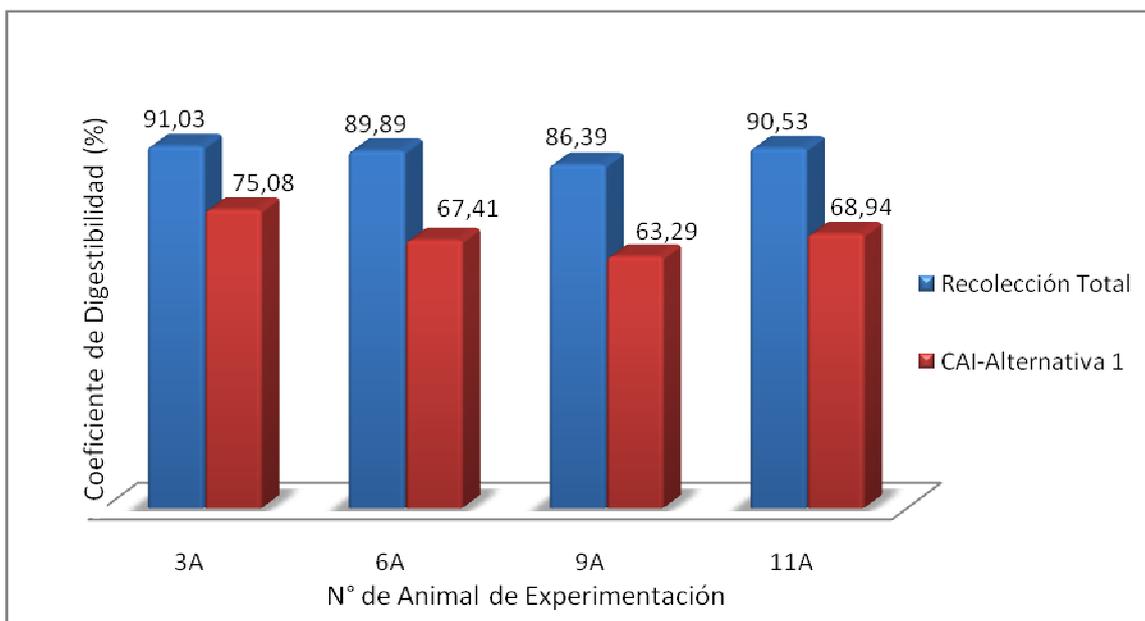
CUADRO N°7. COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD MEDIANTE EL MÉTODO CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLES. ALTERNATIVA 1 (SHRIVASTAVA AND TALAPATRA -1962) EN ALIMENTO BALANCEADO CERDOS DESARROLLO 2 EN CUATRO ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PROCESADORA NACIONAL DE ALIMENTOS CA. PRONACA. QUEVEDO. MARZO DEL 2010.

FECHA	MUESTRA	COEFICIENTE DIGESTIBILIDAD (%)
28/03/2010	3 A	74,98
28/03/2010	3 A	75,37
28/03/2010	3 A	74,88
28/03/2010	6 A	69,53
28/03/2010	6 A	70,18
28/03/2010	6 A	62,51
28/03/2010	9 A	62,48
28/03/2010	9 A	64,36
28/03/2010	9 A	63,03
28/03/2010	11 A	68,85
28/03/2010	11 A	68,88
28/03/2010	11 A	69,08
PROMEDIO		68,68

REALIZADO POR: JESSENIA KATHERINE BUÑAY

Los resultados expresados en el cuadro N° 7, representan el porcentaje del coeficiente de digestibilidad en alimento balanceado cerdos desarrollo 2 aplicando la alternativa 1 del método de cenizas ácido insolubles según Shrivastava y Talapatra -1962 utilizando Ácido

Clorhídrico concentrado, dichos datos no son similares a los obtenidos a través del Método de Recolección Total, el coeficiente de digestibilidad obtenido por CAI Alternativa 1 (SHRIVASTAVA Y TALAPATRA -1962) es 68,68% este es muy inferior con respecto a 89,45% (MRT).



REALIZADO POR: JESSENIA KATHERINE BUÑAY

GRÁFICO No. 2. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD EN PORCENTAJE A TRAVÉS DEL MÉTODO DE RECOLECCIÓN TOTAL Y EL MÉTODO DE CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLES ALTERNATIVA 1 (SHRIVASTAVA AND TALAPATRA -1962) EN ALIMENTO BALANCEADO CERDOS DESARROLLO 2 EN CUATRO ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. DPTO. DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PRONACA. QUEVEDO. MARZO 2010.

En el gráfico 2, se representan los resultados promedios de la determinación del coeficiente de digestibilidad en alimento balanceado Cerdos Desarrollo 2 en cada uno de los animales de experimentación.

Analizando los resultados del gráfico 2, se puede establecer que el método CIA Alternativa 1 presenta valores de Digestibilidad inferiores en relación a los obtenidos a través del método de referencia (RT), los resultados exhiben diferencias significativas.

3.8. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD MEDIANTE EL MÉTODO CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLES. ALTERNATIVA 2 (VOGTMANN-1975) HCl 4 N.

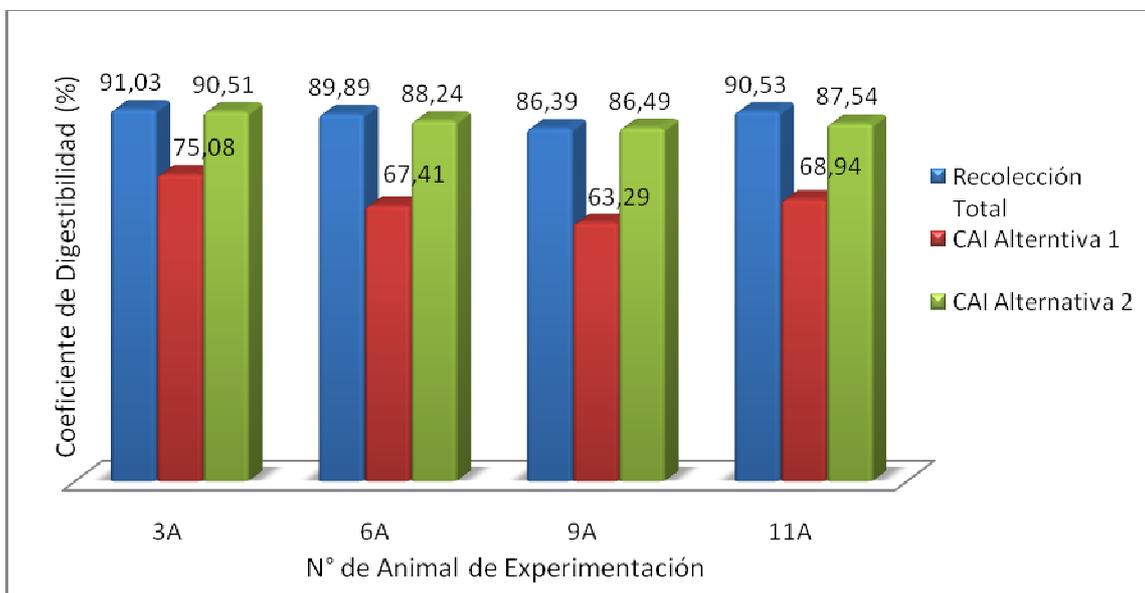
CUADRO N°8. COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD MEDIANTE EL MÉTODO CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLES. ALTERNATIVA 2 (VOGTMANN-1975) EN ALIMENTO BALANCEADO CERDOS DESARROLLO 2 EN CUATRO ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PROCESADORA NACIONAL DE ALIMENTOS CA. PRONACA. QUEVEDO. ABRIL DEL 2010.

FECHA	MUESTRA	COEFICIENTE DIGESTIBILIDAD (%)
10/04/2010	3A	90,60
10/04/2010	3A	90,17
10/04/2010	3A	90,78
10/04/2010	6A	88,02
10/04/2010	6A	88,69
10/04/2010	6A	88,02
10/04/2010	9A	86,27
10/04/2010	9A	86,61
10/04/2010	9A	86,59
10/04/2010	11A	87,89
10/04/2010	11A	87,54
10/04/2010	11A	87,18
PROMEDIO		88,20

REALIZADO POR: JESSENIA KATHERINE BUNAY

Analizando los resultados del cuadro N° 8, apreciamos que el Método Cenizas Ácido Insolubles Alternativa 2 (VOGTMANN-1975) presenta un coeficiente de digestibilidad promedio de 88,20 superior al CAI Alternativa 1 (SHRIVASTAVA Y TALAPATRA -

1962), dándonos una idea que la alternativa 2 presenta un mejor porcentaje de digestibilidad.



REALIZADO POR: JESSENIA KATHERINE BUÑAY

GRÁFICO No. 3. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD EN PORCENTAJE A TRAVÉS DEL MÉTODO DE RECOLECCIÓN TOTAL Y EL MÉTODO DE CENIZAS ACIDO INSOLUBLES ALTERNATIVA 1 (SHRIVASTAVA Y TALAPATRA -1962) Y ALTERNATIVA 2 (VOGTMANN-1975) EN ALIMENTO BALANCEADO CERDOS DESARROLLO 2 EN CUATRO ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. DPTO. DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PRONACA. QUEVEDO. ABRIL 2010.

En el gráfico 3, se representa los resultados promedios de la determinación del coeficiente den digestibilidad en alimento balanceado Cerdos Desarrollo 2, a través de tres métodos de análisis.

Analizando los resultados del gráfico3, se puede establecer que los métodos de Recolección Total y CAI Alternativa 2 muestran valores similares, resultados que además son estadísticamente son significativos.

3.9. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD MEDIANTE EL MÉTODO CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLES ALTERNATIVA 3 (J. VAN KEULEN Y YOUNG-1977).

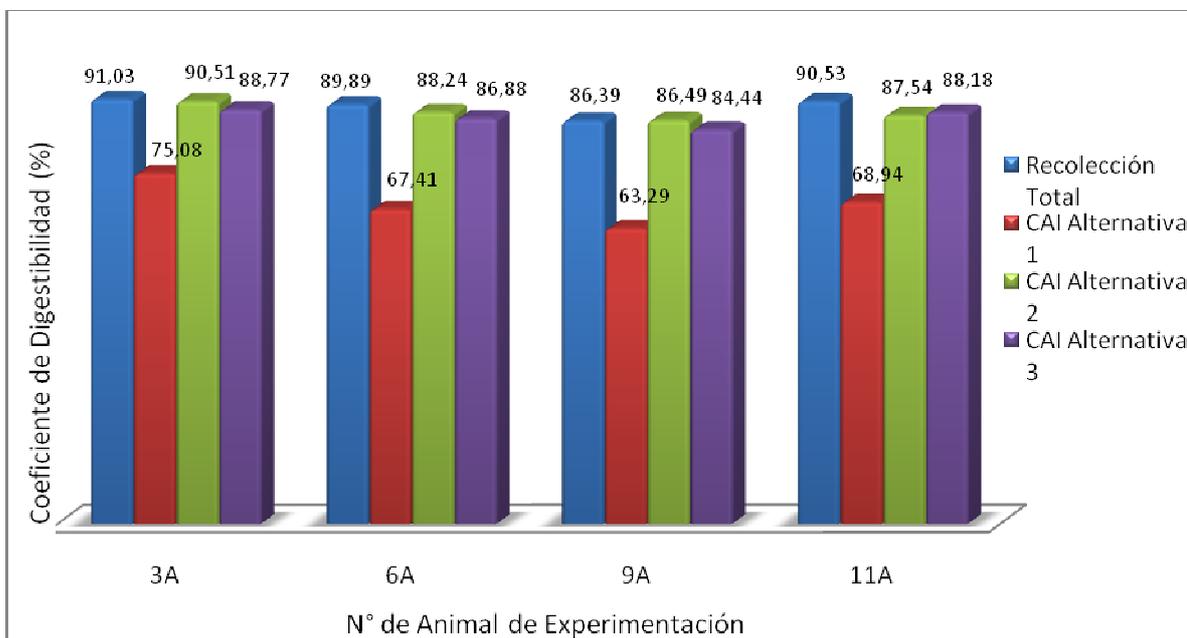
CUADRO N° 9. COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD MEDIANTE EL MÉTODO CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLES ALTERNATIVA 3 (J. VAN KEULEN AND YOUNG-1977) EN ALIMENTO BALANCEADO CERDOS DESARROLLO 2 EN CUATRO ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PROCESADORA NACIONAL DE ALIMENTOS CA. PRONACA. QUEVEDO. ABRIL DEL 2010.

FECHA	MUESTRA	COEFICIENTE DIGESTIBILIDAD (%)
25/04/2010	3A	88,73
25/04/2010	3A	88,71
25/04/2010	3A	88,88
25/04/2010	6A	86,98
25/04/2010	6A	86,89
25/04/2010	6A	86,77
25/04/2010	9A	84,24
25/04/2010	9A	84,35
25/04/2010	9A	84,71
25/04/2010	11A	88,26
25/04/2010	11A	88,27
25/04/2010	11A	88,01
PROMEDIO		87,07

REALIZADO POR: JESSENIA KATHERINE BUÑAY

Examinando los resultados obtenidos en el cuadro N° 9, verificamos que el Método Cenizas Ácido Insolubles Alternativa 3 (J. VAN KEULEN AND YOUNG-1977) presenta un coeficiente de digestibilidad promedio de 87,07 superior al CAI Alternativa 1 (SHRIVASTAVA Y TALAPATRA -1962), pero inferior al Método CAI Alternativa 2 (VOGTMANN-1975) dándonos una idea que la alternativa 2 presenta un mejor

porcentaje de digestibilidad, con respecto a las tres alternativas del Método Cenizas Acido Insolubles.



REALIZADO POR: JESSENIA KATHERINE BUÑAY

GRÁFICO No. 4. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD EN PORCENTAJE A TRAVÉS DEL MÉTODO DE RECOLECCIÓN TOTAL Y EL MÉTODO DE CENIZAS ACIDO INSOLUBLES ALTERNATIVA 1 (SHRIVASTAVA Y TALAPATRA -1962), ALTERNATIVA 2 (VOGTMANN-1975) Y ALTERNATIVA 3 (J. VAN KEULEN AND YOUNG-1977) EN ALIMENTO BALANCEADO CERDOS DESARROLLO 2 EN CUATRO ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. DPTO. DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PRONACA. QUEVEDO. MARZO 2010.

En el gráfico 4, se representa los resultados promedios de la determinación del coeficiente den digestibilidad en alimento balanceado Cerdos Desarrollo 2 de los cuatro animales de experimentación, a través del Método de Recolección Total y las tres alternativas del Método Cenizas Ácido Insolubles.

Analizando los resultados del gráfico 4, se puede establecer que los métodos de Recolección Total y CAI Alternativa 2, así como CAI Alternativa 3 muestran valores

similares, los cuales además muestran que los resultados no presentan diferencias estadísticamente significativas.

3.10. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN, A TRAVÉS DE LA COMPARACIÓN DEL MÉTODO ESTABLECIDO MÉTODO DE RECOLECCIÓN TOTAL CON LAS TRES ALTERNATIVAS DEL MÉTODO CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLES.

3.10.1. DETERMINACIÓN DEL PARÁMETRO DE VALIDACIÓN: INCERTIDUMBRE DE RESULTADOS

CUADRO N°10. INCERTIDUMBRE DE LOS RESULTADOS DEL COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD (%), COMPARANDO EL MÉTODO DE RECOLECCIÓN TOTAL CON EL MÉTODO DE CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLES ALTERNATIVA 1 (SHRIVASTAVA AND TALAPATRA -1962). DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PRONACA. QUEVEDO. ABRIL DEL 2010.

# ANIMAL	RECOLECCIÓN TOTAL	CAI ALTERNATIVA 1	%U
3A	90,94	74,98	22,57
3A	91,12	75,37	22,27
3A	91,03	74,88	22,84
6A	89,94	69,53	28,86
6A	89,85	70,18	27,82
6A	89,89	62,51	38,72
9A	86,03	62,48	33,31
9A	86,82	64,36	31,76
9A	86,33	63,03	32,95
11A	90,23	68,85	30,23

11A	90,84	68,88	31,05
11A	90,53	69,08	30,34
PROMEDIO			29,39

REALIZADO POR: JESSENIA KATHERINE BUNAY

CUADRO N°11. INCERTIDUMBRE DE LOS RESULTADOS DEL COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD (%), COMPARANDO EL MÉTODO DE RECOLECCIÓN TOTAL CON EL MÉTODO DE CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLES ALTERNATIVA 2 (VOGTMANN-1975). DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PRONACA. QUEVEDO. ABRIL DEL 2010.

# ANIMAL	RECOLECCIÓN	CAI	%U
	TOTAL	ALTERNATIVA 2	
3A	90,94	90,60	0,48
3A	91,12	90,17	1,35
3A	91,03	90,78	0,35
6A	89,94	88,02	2,71
6A	89,85	88,69	1,65
6A	89,89	88,02	2,64
9A	86,03	86,27	0,34
9A	86,82	86,61	0,30
9A	86,33	86,59	0,36
11A	90,23	87,89	3,30
11A	90,84	87,54	4,67
11A	90,53	87,18	4,74
PROMEDIO			1,91

REALIZADO POR: JESSENIA KATHERINE BUNAY

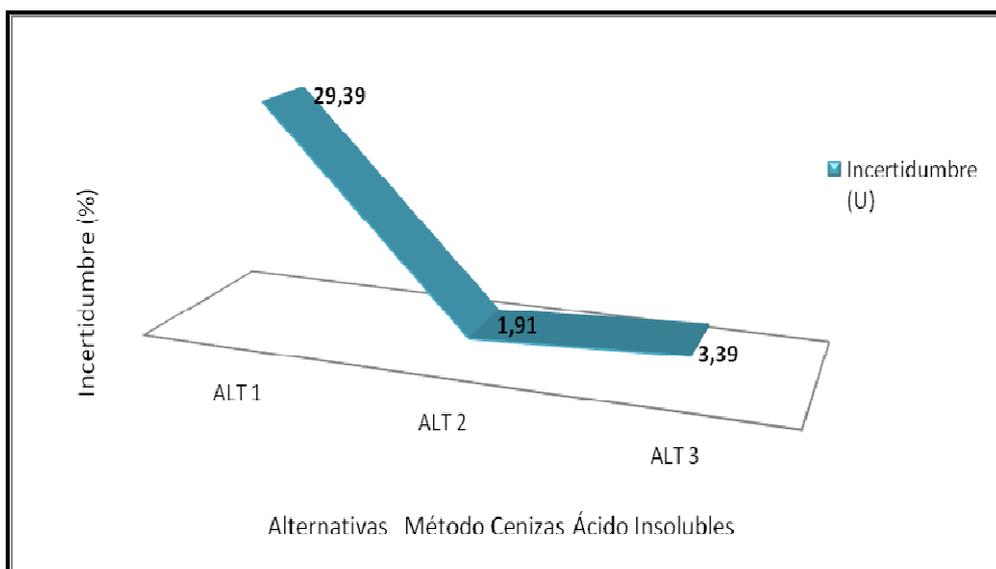
CUADRO N°12. INCERTIDUMBRE DE LOS RESULTADOS DEL COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD (%), COMPARANDO EL MÉTODO DE RECOLECCIÓN TOTAL CON EL MÉTODO DE CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLES ALTERNATIVA 3 (J. VAN KEULEN AND YOUNG-1977). DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PRONACA. QUEVEDO. ABRIL DEL 2010.

# ANIMAL	RECOLECCIÓN TOTAL	CIA ALTERNATIVA 3	%U
3A	90,94	88,73	3,13
3A	91,12	88,71	3,40
3A	91,03	88,88	3,05
6A	89,94	86,98	4,18
6A	89,85	86,89	4,19
6A	89,89	86,77	4,41
9A	86,03	84,24	2,53
9A	86,82	84,35	3,50
9A	86,33	84,71	2,29
11A	90,23	88,26	2,78
11A	90,84	88,27	3,64
11A	90,53	88,01	3,57
PROMEDIO			3,39

REALIZADO POR: JESSENIA KATHERINE BUNAY

Analizando los resultados de los cuadros N° 10, N° 11 y N° 12, apreciamos que el porcentaje de incertidumbre en el Método Cenizas Ácido Insolubles Alternativa 2 (VOGTMANN-1975) presenta un promedio de 1,91% relativamente inferior al CAI Alternativa 3 (J. VAN KEULEN AND YOUNG-1977) y presenta una diferencia muy

significativa con el Método CAI Alternativa 1 (SHRIVASTAVA Y TALAPATRA - 1962), dándonos una idea que la alternativa 2 presenta resultados con menor incertidumbre comparados con el método establecido RT, dicho valor esta dentro de los parámetros designados según la norma INEN-ISO/IEC 17025:2000 ($U < 15\%$), aplicada en la validación.



REALIZADO POR: JESSENIA KATHERINE BUÑAY

GRÁFICO No. 5. DETERMINACIÓN DE INCERTIDUMBRE DE LOS RESULTADOS DE COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD A TRAVÉS DE LA COMPARACIÓN DEL MÉTODO DE RECOLECCIÓN TOTAL CON CADA UNA DE LAS ALTERNATIVAS DEL MÉTODO DE CENIZAS ACIDO INSOLUBLES ALTERNATIVA 1 (SHRIVASTAVA Y TALAPATRA -1962), ALTERNATIVA 2 (VOGTMANN-1975) Y ALTERNATIVA 3 (J. VAN KEULEN AND YOUNG-1977). DPTO. DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PRONACA. QUEVEDO. MARZO 2010.

En el gráfico 5, se representa los resultados promedios de la determinación de Incertidumbre de los Resultados de coeficiente de digestibilidad, a través de la comparación de los resultados del Método de Recolección Total y las tres alternativas del Método Cenizas Ácido Insolubles.

Analizando los resultados del gráfico 5, se puede establecer que el Método de CAI Alternativa 2 (Vogtmann-

1975) los métodos de Recolección Total y CAI Alternativa 2, así como CAI Alternativa 3 muestran valores similares, los cuales demuestran que los resultados no presentan diferencias significativas.

3.10.2. DETERMINACIÓN DEL PARÁMETRO DE VALIDACIÓN: EXACTITUD.

CUADRO N° 13. EXACTITUD OBTENIDA DE LOS RESULTADOS DE COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD (%), DE EL MÉTODO DE CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLES ALTERNATIVA 1 (SHRIVASTAVA AND TALAPATRA - 1962) FRENTE AL MÉTODO DE RECOLECCIÓN. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PRONACA. QUEVEDO. MAYO DEL 2010.

# ANIMAL	RT	CIA alt1	%Recuperación
3A	90,94	74,98	82,45
3A	91,12	75,37	82,72
3A	91,03	74,88	82,26
6A	89,94	69,53	77,31
6A	89,85	70,18	78,11
6A	89,89	62,51	69,55
9A	86,03	62,48	72,62
9A	86,82	64,36	74,13
9A	86,33	63,03	73,01
11A	90,23	68,85	76,31
11A	90,84	68,88	75,83
11A	90,53	69,08	76,30
PROMEDIO			76,72

REALIZADO POR: JESSENIA KATHERINE BUNAY

Analizando los resultados del cuadro N° 13, apreciamos los valores de exactitud que esta dados por el porcentaje de recuperación según la norma INEN-ISO/IEC 17025:2000, el

promedio de Exactitud obtenida en el método CIA alt 1 a través de la comparación con el método de referencia RT, es de 76,72% siendo relativamente bajo a lo establecido en la normativa aplicada, considerando que un método tiene exactitud con otro con un porcentaje de recuperación del 95 al 105 % en todos sus niveles.

CUADRO N°14. EXACTITUD OBTENIDA DE LOS RESULTADOS DE COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD (%), DEL MÉTODO DE CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLES ALTERNATIVA 2 (VOGTMANN-1975) COMPARANDO CON EL MÉTODO DE RECOLECCIÓN TOTAL. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PRONACA. QUEVEDO. ABRIL DEL 2010.

# ANIMAL	RT	CIA alt 2	%Recuperación
3A	90,94	90,60	99,62
3A	91,12	90,17	98,95
3A	91,03	90,78	99,73
6A	89,94	88,02	97,87
6A	89,85	88,69	98,70
6A	89,89	88,02	97,92
9A	86,03	86,27	100,28
9A	86,82	86,61	99,76
9A	86,33	86,59	100,30
11A	90,23	87,89	97,41
11A	90,84	87,54	96,37
11A	90,53	87,18	96,30
PROMEDIO			98,60

REALIZADO POR: JESSENIA KATHERINE BUÑAY

Analizando los resultados del cuadro N° 14, observamos los valores de exactitud, calculando el porcentaje de recuperación del Método CIA alt 2 frente al Método de referencia (RT), dándonos un promedio de 98,60%, dicho valor esta dentro de los parámetros designados según la norma INEN-ISO/IEC 17025:2000 (95 al 105%),

aplicada en la validación, los valores obtenidos nos demuestran que el método CIA alt 2, presentan mayor similitud con los resultados obtenidos en el método de Recolección Total.

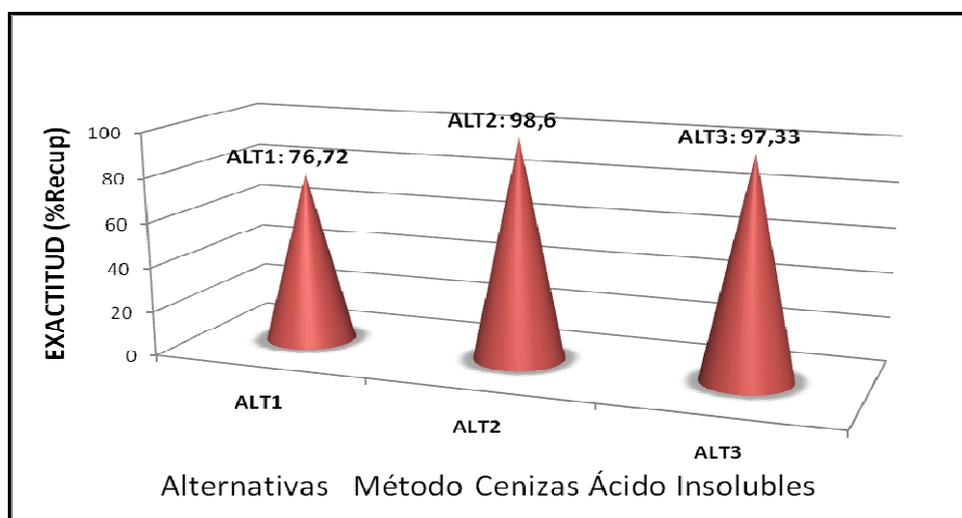
CUADRO N°15. EXACTITUD OBTENIDA DE LOS RESULTADOS DE COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD (%), DEL MÉTODO DE CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLES ALTERNATIVA 3 (J. VAN KEULEN AND YOUNG-1977) COMPARANDO CON EL MÉTODO DE RECOLECCIÓN TOTAL. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PRONACA. QUEVEDO. ABRIL DEL 2010.

# ANIMAL	RT	CIA alt 3	%Recuperación
3A	90,94	88,73	97,57
3A	91,12	88,71	97,36
3A	91,03	88,88	97,63
6A	89,94	86,98	96,71
6A	89,85	86,89	96,71
6A	89,89	86,77	96,53
9A	86,03	84,24	97,92
9A	86,82	84,35	97,15
9A	86,33	84,71	98,13
11A	90,23	88,26	97,82
11A	90,84	88,27	97,17
11A	90,53	88,01	97,21
PROMEDIO			97,33

REALIZADO POR: JESSENIA KATHERINE BUÑAY

Analizando los resultados del cuadro N° 15, apreciamos los valores de exactitud, dados por el porcentaje de recuperación, dichos valores obtenidos (97,33% promedio) de la comparación del Método CIA alt 3 con el método de referencia (RT), nos dan la idea que los datos obtenidos son similares, además de la confirmación de los límites de la normativa INEN-ISO/IEC 17025:2000 (exactitud del 95 al 105%) sin embargo estos

valores se encuentran por debajo de los resultados de exactitud obtenidos en el Método CIA alt 2.



REALIZADO POR: JESSENIA KATHERINE BUÑAY

GRÁFICO No. 6. DETERMINACIÓN DE EXACTITUD DE LOS RESULTADOS DE COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD DE LOS MÉTODOS CENIZA INSOLUBLE EN ÁCIDO (ALT1, ALT2, ALT3) FRENTE AL MÉTODO DE REFERENCIA (RECOLECCIÓN TOTAL). DPTO. DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PRONACA. QUEVEDO. MARZO 2010.

En el gráfico 6, representa los resultados promedios de la determinación de EXACTITUD de los Resultados de coeficiente de digestibilidad, de la comparación de las tres alternativas del Método Cenizas Insolubles en Ácido con el Método de Referencia (Recolección Total) aplicado en el laboratorio de PRONACA Quevedo.

Analizando los resultados del gráfico 6, se puede establecer que el Método de CAI Alternativa 2 (Vogtmann-1975), presenta mayor exactitud en sus resultados con los del método de Recolección Total.

**3.10.3. DETERMINACIÓN DEL PARÁMETRO DE VALIDACIÓN:
REPETIBILIDAD.**

CUADRO N° 16. REPETIBILIDAD OBTENIDA DE LOS RESULTADOS DE COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD (%), DEL MÉTODO DE CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLES ALTERNATIVA 1 (SHRIVASTAVA AND TALAPATRA - 1962) FRENTE AL MÉTODO DE RECOLECCIÓN TOTAL. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PRONACA. QUEVEDO. MAYO DEL 2010.

# ANIMAL	% Digestibilidad		REPETIBILIDAD (%) cv
	RECOLECCIÓN TOTAL	CIA ALT 1	
3	90,94	74,98	13,60
3	91,12	75,37	13,38
3	91,03	74,88	13,77
6	89,94	69,53	18,10
6	89,85	70,18	17,38
6	89,89	62,51	25,40
9	86,03	62,48	22,43
9	86,82	64,36	21,01
9	86,33	63,03	22,06
11	90,23	68,85	19,00
11	90,84	68,88	19,44
11	90,53	69,08	19,01
PROMEDIO			18,71

REALIZADO POR: JESSENIA KATHERINE BUNAY

Analizando los resultados del cuadro N° 16, verificamos que los valores de Repetibilidad obtenidos entre la comparación del método CIA Alt 1 con el método de referencia (Recolección Total), están fuera del criterio de aceptación ($c.v \leq 2\%$) según la norma

INEN-ISO/IEC 17025:2000, el promedio de Repetibilidad es de 18,71% siendo muy superior al límite de aceptación.

CUADRO N° 17. REPETIBILIDAD OBTENIDA DE LOS RESULTADOS DE COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD (%), DEL MÉTODO DE CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLES ALTERNATIVA 2 (VOGTMANN-1975) COMPARANDO CON EL MÉTODO DE RECOLECCIÓN TOTAL. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PRONACA. QUEVEDO. ABRIL DEL 2010.

# ANIMAL	% Digestibilidad		REPETIBILIDAD (%)
	RECOLECCIÓN TOTAL	CIA ALT 2	
3	90,94	90,60	0,27
3	91,12	90,17	0,74
3	91,03	90,78	0,19
6	89,94	88,02	1,52
6	89,85	88,69	0,92
6	89,89	88,02	1,49
9	86,03	86,27	0,20
9	86,82	86,61	0,17
9	86,33	86,59	0,21
11	90,23	87,89	1,85
11	90,84	87,54	2,62
11	90,53	87,18	2,67
PROMEDIO			1,07

REALIZADO POR: JESSENIA KATHERINE BUÑAY

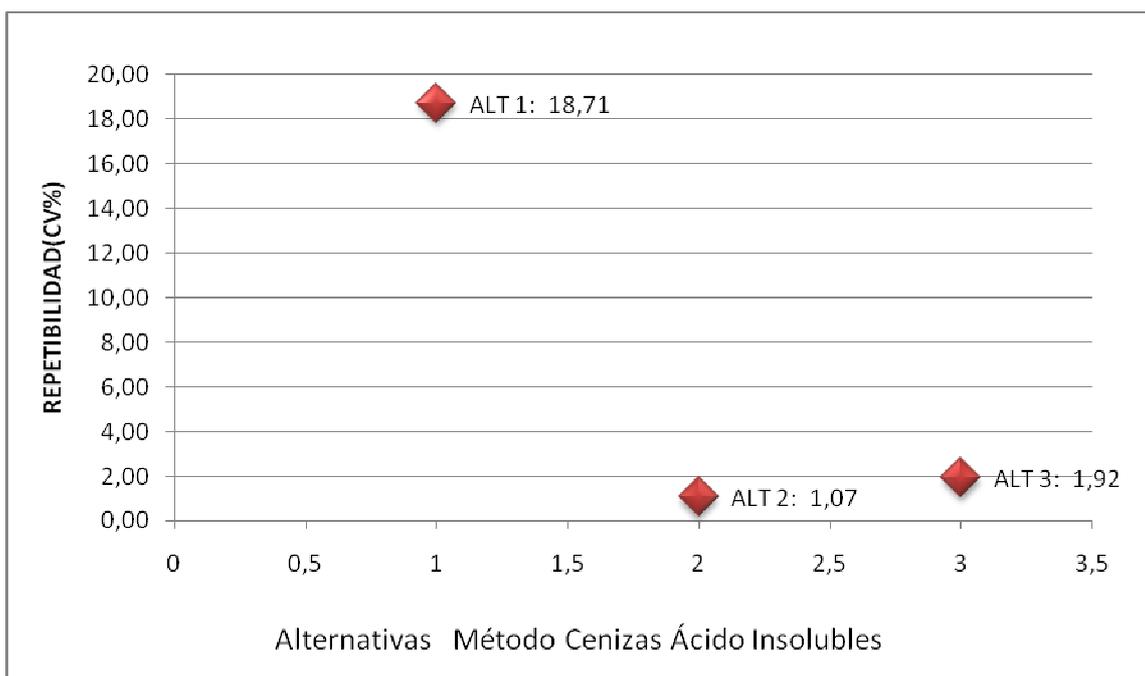
Analizando los resultados del cuadro N° 17, apreciamos que los valores obtenidos de Repetibilidad del método CIA Alt 2 mediante la comparación de los resultados del coeficiente de digestibilidad con los resultados obtenidos del Método de Referencia Recolección Total, están dentro del criterio de aceptación ($c.v \leq 2\%$) según la norma INEN-ISO/IEC 17025:2000, el promedio obtenido es 1,07%, siendo el coeficiente de variación el parámetro estadístico utilizado como criterio de aceptación del parámetro de validación.

CUADRO N° 18. REPETIBILIDAD OBTENIDA DE LOS RESULTADOS DE COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD (%), DEL MÉTODO DE CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLES ALTERNATIVA 3 (J. VAN KEULEN AND YOUNG-1977) COMPARANDO CON EL MÉTODO DE RECOLECCIÓN TOTAL. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PRONACA. QUEVEDO. ABRIL DEL 2010.

# ANIMAL	% Digestibilidad		REPETIBILIDAD (%)
	RECOLECCIÓN TOTAL	CIA ALT 3	
3	90,94	88,73	1,74
3	91,12	88,71	1,89
3	91,03	88,88	1,69
6	89,94	86,98	2,36
6	89,85	86,89	2,37
6	89,89	86,77	2,50
9	86,03	84,24	1,48
9	86,82	84,35	2,04
9	86,33	84,71	1,34
11	90,23	88,26	1,56
11	90,84	88,27	2,03
11	90,53	88,01	2,00
PROMEDIO			1,92

REALIZADO POR: JESSENIA KATHERINE BUNAY

Analizando los resultados del cuadro N° 18, apreciamos los valores de REPETIBILIDAD, determinados por el coeficiente de variación, de la comparación del método CIA alt3 con el método de recolección Total, se obtiene un promedio de 1,92% el cual se encuentra dentro del criterio de aceptación ($c.v \leq 2\%$) según la norma INEN-ISO/IEC 17025:2000, sin embargo el % obtenido en el Método CIA Alt2 es mejor ya que es ligeramente inferior.



REALIZADO POR: JESSENIA KATHERINE BUÑAY

GRÁFICO No. 7. DETERMINACIÓN DE REPETIBILIDAD DE LOS RESULTADOS DE COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD DE LOS MÉTODOS CENIZA INSOLUBLE EN ÁCIDO (ALT1, ALT2, ALT3) FRENTE AL MÉTODO DE REFERENCIA (RECOLECCIÓN TOTAL). DPTO. DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PRONACA. QUEVEDO. MARZO 2010.

En el gráfico 7, se representa los resultados promedios de la determinación de REPETIBILIDAD de los Resultados de coeficiente de digestibilidad, de la comparación de las tres alternativas del Método Cenizas Insolubles en Ácido con el Método de Referencia (Recolección Total) aplicado en el laboratorio de PRONACA Quevedo. Siendo el Método CAI Alternativa 2 (Vogtmann-1975), el que presenta más bajo el Coeficiente de Variación, un promedio de 1,07, estando dentro de los parámetros para la validación (según según la norma INEN-ISO/IEC 17025:2000).

3.10.4. DETERMINACIÓN DEL PARÁMETRO DE VALIDACIÓN: LIMITE DE DETECCIÓN.

CUADRO N° 19. LIMITE DE DETECCIÓN OBTENIDA DE LOS RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO APLICADO EN MÉTODOS CIA. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PRONACA. QUEVEDO. ABRIL DEL 2010.

MÉTODOS CIA	% CENIZAS INSOLUBLES	LIMITE DE DETECCIÓN
ALT 1	0,01198	0,01267
ALT 2	0,01175	0,01186
ALT 3	0,01178	0,01263

REALIZADO POR: JESSENIA KATHERINE BUÑAY

Analizando los resultados del cuadro N° 19, apreciamos los valores de Limite de Detección, determinados a partir del análisis del blanco (% cenizas insolubles en acido), en cada una de las Alternativas del Método de Cenizas Insolubles en ácido, los limites de detección obtenidos se encuentran dentro del criterio de aceptación según la norma INEN-ISO/IEC 17025:2000, que es < 0,1%, sin embargo el Método CIA Alternativa 2 **VOGTMANN-1975**, presenta el Limite de Detección más inferior, siendo de mejor aceptación.

3.10.5. DETERMINACIÓN DEL PARÁMETRO DE VALIDACIÓN: ESPECIFICIDAD.

CUADRO N° 20. ESPECIFICIDAD OBTENIDA DE LOS RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO APLICADO EN MÉTODOS CIA. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PRONACA. QUEVEDO. ABRIL DEL 2010.

Método Cenizas Acido Insolubles	#crisol	peso crisol	Peso muestra	Peso (mc+c)	% ceniza insoluble INTERFERENCIA
Alternativa 1	60	35,5807	0,8462	35,5808	0,01182
	90	33,9021	0,8236	33,9022	0,01214
Alternativa 2	7	28,4390	0,8530	28,4391	0,01172
	130	25,8330	0,8491	25,8331	0,01178

Alternativa 3	15	29,1714	0,8346	29,1715	0,01198
	4	26,2737	0,8634	26,2738	0,01158

REALIZADO POR: JESSENIA KATHERINE BUNAY

Analizando los resultados del cuadro N° 20, apreciamos los valores de interferencia en el análisis que van a determinar la ESPECIFICIDAD del método, determinados por el porcentaje de ceniza insoluble en ácido del papel filtro cuantitativo (análisis de blanco) en cada una de las Alternativas del Método de Cenizas Insolubles en Ácido, verificamos que el valor promedio es de 0,01 el cual está dentro los criterios de tolerancia según la norma INEN-ISO/IEC 17025:2000, que es $< 0,1\%$, hallándose formadas la cenizas insolubles en ácido por minerales no digeribles como el sílice, o bien por minerales que se encuentran formando compuestos muy estables. Este valor es el conocimiento que tenemos de interferencia por parte del papel filtro cuantitativo.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES

1. La digestibilidad del Alimento Balanceado Cerdos Desarrollo 2, determinada mediante el método de Cenizas Ácido Insolubles Alternativa₁ Shrivastava y Talapatra -1962, utilizando Ácido Clorhídrico concentrado, Alternativa₂

Vogtmann-1975, utilizando Ácido Clorhídrico 2 N, y la Alternativa₃ J. Van Keulen y Young-1977, utilizando Ácido Clorhídrico 4 N, poseen entre sí diferencias en el coeficiente de digestibilidad, según los resultados expresados en los cuadros N° 7, N° 8 y N° 9; encontrándose que la alternativa 2 es la que presenta mayor semejanza con respecto al método de referencia Recolección Total (Adeola O.), según el cuadro N° 6, obteniendo un promedio en el coeficiente de digestibilidad de 89,45%, datos que se encuentran analizados en el Grafico N° 4.

2. Los resultados del parámetro de validación Incertidumbre en las mediciones expresados en los cuadros N° 10, N° 11 y N° 12 de las tres alternativas del método cenizas ácido insolubles frente al método de Recolección Total, indican que para la determinación del Coeficiente de Digestibilidad se debe aplicar la Alternativa 2, debido al menor porcentaje de interferencia que presenta en los resultados demostrando que cumple con el parámetro de validación al tener baja dispersión de sus valores. Tal motivo se debe a que no existe en el método de análisis pre incineración de la muestra, donde ocurre pérdida del material incinerado, comparación realizada en el Gráfico N° 5.

3. La exactitud obtenida entre la comparación de los resultados del Método CIA Alternativa 1 con los de Recolección Total fueron bajos, estos se determinaron a través del porcentaje de recuperación obteniéndose un promedio de 76,72%, estando fuera del límite inferior del parámetro de validación según la norma INEN-ISO/IEC 17025:2000, en la comparación con el método CIA Alternativa 2 con el método de Recolección Total, se obtiene un porcentaje promedio de 98,60%, datos expresados en el cuadro N° 14 lo que demuestra la cercanía de los resultados obtenidos en el análisis, sin embargo en la comparación del método CIA Alternativa 3 con el método de Recolección Total se obtiene un porcentaje de recuperación del 97,33% estando también dentro de los límites de especificación, datos analizados en la Gráfica N° 6.

4. Los datos promedios del parámetro de validación Repetibilidad, presentados en los cuadros N° 16, N° 17 y N° 18 de las diferentes alternativas, dejan ver la proximidad entre los resultados obtenidos en el método CIA Alternativa 2 frente al método de referencia Recolección Total realizadas bajo las mismas condiciones de medición, parámetro valorado a través del coeficiente de variación, siendo el promedio 1,07% de la Alternativa 2, cumpliendo con la especificación de la norma INEN-ISO/IEC 17025, análisis realizado en la Gráfica N° 7.

5. Los valores del parámetro límite de detección de las alternativas del método de Cenizas Ácido Insolubles expresadas en el cuadro N° 19, son constantes en los tres métodos obteniendo datos de 0,01% de cenizas insolubles en ácido, cumpliendo con la aportación máxima de cenizas insolubles del papel filtro cuantitativo (Whatman No. 41) determinado a través del análisis de muestras blanco en las diferentes alternativas, cumpliendo con el criterio de la norma INEN-ISO/IEC 17025, que indica que el Limite de Detección para validar un método de análisis debe ser $< 0,1\%$ del analito.

6. La especificidad presentada entre las diferentes alternativas del método CIA, está dada por la determinación de la interferencia que puede existir en un compuesto que aporte el analito a valorarse, los cuales son minerales no digestibles como el sílice, o bien por minerales que se encuentran formando compuestos muy estables. En el cuadro N° 20 se presenta el valor que aporta el papel filtro cuantitativo, y que va a interferir en la especificidad del método, sin embargo el valor obtenido dentro de lo tolerado según la norma aplicada en la validación.

7. Se ha implementado el método de análisis Determinación de Cenizas Ácido Insolubles, a través de la Alternativa 2 **VOGTMANN-1975**, utilizando Ácido Clorhídrico 4 N, y sin presentar pre incineración de la muestra antes de su tratamiento ácido, por la obtención de resultados similares al método de referencia Recolección Total, y por el cumplimiento de los cinco parámetros de validación evaluados en el presente trabajo, técnica descrita en el documento NA-AC15-M50, (*Anexo N° 7*).

8. Se implementó el Método de análisis Cenizas Ácido Insolubles NA-AC15-M50, el cual se utiliza como marcador indirecto para determinar digestibilidad en piensos o materias primas de piensos, reemplazando al método de Recolección Total, reduciendo así el tiempo y esfuerzo en la obtención y análisis de las muestras, con lo cual se disminuye costos en las investigaciones y se mejora la calidad de los alimentos.

CAPÍTULO V

5. RECOMENDACIONES

1. En la determinación de Cenizas Insolubles en ácido, se debe tener precaución en el manejo de reactivos y material de laboratorio, además contar con los equipos adecuados de protección personal (EPP), teniendo muy en cuenta el riesgo que puede existir como salpicaduras y quemaduras por la utilización del Ácido Clorhídrico.
2. En el Método de Cenizas Ácido Insolubles se debe filtrar las muestras cuando se encuentran aun calientes, añadiéndole el agua destilada a una temperatura adecuada

para que pueda solubilizar todo el contenido de ácido y se siga eliminado en los enjuagues.

3. Se debe comprobar la eliminación completa del ácido Clorhídrico en las cenizas ya tratadas antes de su incineración, a través de una solución de Nitrato de Plata, se agrega al líquido resultante del enjuague de la muestra, se realiza este procedimiento hasta que ya no se evidencie la formación de un precipitado blanquecino.
4. Se debe realizar nuevas investigaciones ampliando el método de determinación de Humedad en materia fecal y establecer el Método de análisis adecuado. se puede realizar nuevas investigaciones referentes al Método de Cenizas Ácido Insolubles, para determinar si existen diferencias cuando se utiliza la muestra seca y cuando la muestra se la utiliza fresca, con un valor teórico de humedad.

CAPÍTULO VI

6. RESUMEN

Investigación con el propósito de validar el método Cenizas Ácido Insolubles (CIA) para determinar digestibilidad en alimento balanceado, comparándolo con el método de Recolección Total (RT), realizando tres alternativas del Método CIA, con la finalidad de simplificar procedimientos, reducir la labor y costos de diversas determinaciones, se realizó en la Procesadora Nacional de Alimentos C.A. del cantón Quevedo.

Con cuatro Cerdos de genética PIC, alimento balanceado “Cerdos Desarrollo 2”, muestras de heces fecales obtenidas de la digestión y con equipos como balanza analítica, estufa y mufla, se investigó de octubre 2009 a mayo 2010.

En el método CIA se utilizó diferentes concentraciones de HCl, y de pre-incineración de las muestras, en las tres alternativas, Alternativa 1 (Shrivastava and Talapatra -1962), Alternativa 2. (Vogtmann-1975), Alternativa 3. (J. Van Keulen and Young-1997).

El coeficiente de digestibilidad obtenido por el método RT es 89,45%, fue comparado con el método CIA Alternativa 2, utilizando HCl 4N, obteniéndose un valor de 88,20%; los valores obtenidos de parámetros de validación en la comparación de los dos métodos, se hallaron acorde a la norma INEN-ISO/IEC 17025:2000, obteniendo una Incertidumbre 1,91%, Exactitud 98,60%, Repetibilidad 1,07%, Limite de Detección 0,01186%, Especificidad 0,01175%.

El Método CIA Alternativa 2 reduce el tiempo de análisis de 7 a 4 meses y el esfuerzo en la obtención de la muestra, ya que se la toma una vez por semana, sin realizar una recolección total de heces. Este método es utilizable para desarrollar determinaciones más rápidas y precisas de digestibilidad.

SUMMARY

This investigation dealt with validating the Insoluble Acid Ash to determine digestibility in the balanced feed as compared to the Total Recollection Method, to simplify procedures, reduce labour and costs of different determinations; it was carried out in the National Food Processing Plant C.A. of the Quevedo canton.

With four genetic-PIC pigs, balanced feed "Cerdos Desarrollo 2", fecal samples obtained from digestion and equipment such as the analytic balance, stove and muffle the investigation was carried out from October 2009 to May 2010. In the CIA method different HCl concentration and pre-incineration samples were used in three alternatives, Alternative 1 (Shrivastava and Talapatra-1962), Alternative 2 (Vogtman-1975) and Alternative 3 (J. Van Keulen and Young-1997).

The digestibility coefficient obtained by the methods RT is 89.45%; it was compared to the CIA methods, Alternative 2, using HCL 4N, resulting a value of 88.20%; the values obtained of validation parameters as compared to the two methods were according to the norm INEN-ISO/IEC 17025:2000 with 1,91% uncertainty, 98,60% Accuracy, 1,07% Repeatability, 0,01186% Detection Limit and 0,01175% Specificity.

The CIA method, Alternative 2 reduces the analysis time from 7 to a months and the sample obtainment effort as it is taken once a week without carrying out a total feces collection. This method is usable for developing more rapid and precise digestibility determinations.

CAPÍTULO VII

7. BIBLIOGRAFÍA

7.1. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

1. **ÁLVAREZ A.** 1994. Pruebas de selectividad química. México: McGraw-Hill. pp. 128-130
2. **BATTY J., C.** 1989. Fundamentos de la ingeniería de alimentos. España: Continental. pp. 210-220
3. **BRESCIA F.** 1966. Métodos de laboratorio químico: fundamentos de química. 2ª.ed. España: Continental. pp. 114-127.
4. **CAVANILLAS R.** 1980. Nomenclatura y formulación químicas. 14ª.ed. Madrid: Dossat. pp. 105-112
5. **CHÉRREZ R. CARLOS M.** 2004. Validación de la metodología para la cuantificación de macro y micro elementos en suelos agrícolas por absorción atómica. Tesis Dr. en Bioquímica y Farmacia. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. pp. 75-80
6. **DUDENKOV S.V.** 1980. Fundamentos de la teoría y la práctica de empleo de reactivos. Alemania: Mir. pp. 92-96.
7. **FLASCHKA H.A.** 1984. Química analítica cuantitativa. Madrid: Continental. pp. 42-54

8. **FONSECA C. LUIS W.** 2004. Validación de métodos para mejorar la desalinización de crudo en la planta Parsons. Tesis Dr. en Bioquímica y Farmacia. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. pp. 24-32
9. **FORO BIOQUÍMICO.**
<http://www.forobioquimico.com.ar/glosario.html>.
20070620
10. **GARCÍA G., J.** 2004. Industrias Químicas y Agroalimentarias: análisis y ensayos. España: Alfaomega. pp. 14-27
11. **GESTIÓN DE LA CALIDAD EN LABORATORIOS**
http://ecuador.acambiode.com/producto_6654862565350794754562600216698.html
20060922
12. **GUÍA DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS**
<http://www.ministeriodesalud.go.cr/protocolos/guiavalidacionmetodosanaliticos.pdf>
20070411
13. **HAMILTON L., F.** 1969. Cálculos de química analítica. 3ª.ed. México: McGraw-Hill. pp. 103-122
14. **HARRIS D. C.** 1992. Análisis Químico Cuantitativo. 2ª.ed. Canadá: Iberoamericana. pp. 72-85
15. **HART A.M. y LESLIE F.** 1977. Análisis moderno de los alimentos. Chile: Acribia. pp. 35-47
16. **JANDER G.** 1961. Análisis volumétrico: teoría y práctica de los procedimientos. 4ª.ed. España: Hispanoamérica. pp. 57-63
17. **KIRK R. y OTROS.** 1996. Composición y Análisis de Alimentos de Pearson. 2ª.ed. Madrid: Continental. pp. 57-68

18. **KOTB A. y OTROS.** 1972. Marcadores en nutrición. 3^a.ed. Argentina: Persa. pp. 42-53
19. **MAIER H., G.** 1981. Métodos Modernos de Análisis de Alimentos: métodos ópticos. Chile: Acribia. pp. 36-48
20. **MAYER L.** 1978. Métodos de la Industria Química: en diagramas de flujo. Chile: Reverte. pp. 109-122
21. **MAYNARD, L., y OTROS.** 1969. La Nutrición Animal. 6^a.ed. Nueva York: McGraw-colina. pp. 16-22.
22. **MULLER H., G.** 1985. Nutrición y Ciencia de los alimentos. Chile: Acribia. pp. 27-45.
23. **NIELSEN S.** 2007. Análisis de los Alimentos: manual de Laboratorio. Chile: Acribia. pp. 17-18,36-41.
24. **PECSOK L.** 1973. Métodos modernos de análisis químico. Perú: Limusa. pp. 46-51
25. **PRIETO C., S.** 1960. Operativa Técnica para Industrias y Laboratorios Químicos. Madrid: Dossat. pp. 40-47
26. **SNELL Cornelia.** 1966. Fundamentos de química aplicada, Técnicas Marcombo. Pp. 68-73
27. **VALIDACIÓN DE PROCESOS**
http://ecuador.acambiode.com/producto_25541576453505566694626002135251.html
20050611
28. **WALTON H., F.** 1964. Principios y métodos de análisis químico. 4^a.ed. Chile: Reverté. pp. 154-161
29. **WILLARD H., H.** 1978. Métodos instrumentales de análisis. España: Continental. pp. 65-68

30. **YÚFERA P.** 1979. Química Agrícola, III Alimentos. Madrid: Alhambra. pp. 142-155.

7.2. BIBLIOGRAFÍA ESPECÍFICA

31. **ADEOLA O.** 1997. Digestion and Balance Techniques in Pigs: swine nutrition. 2^a.ed. Chicago: Internacional. pp. 903-916.
32. **CASTELLUCCI F.** 2005. Recomendaciones armonizadas para la validación de métodos de análisis en un solo laboratorio. Paris.
http://news.reseau-concept.net/images/oiv_es/Client/.pdf
20050720
33. **GUTIÉRREZ F Y OTROS.** 2009. Coeficientes de digestibilidad aparente de harina de pescado peruana y maíz amarillo duro para *Colossoma macropomum*. Revista peruana biología. 15(2): 111-115
<http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/v15n2/pdf/a18v15n2.pdf>
[20090212](http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/v15n2/pdf/a18v15n2.pdf)
34. **COMPARACIÓN DE CUATRO TÉCNICAS PARA A ESTIMACIÓN DEL CONSUMO DE FORRAJE POR OVINOS EN UNA PASTURA DE *PANICUM COLORATUM* L.** 2008. vol.68. n.3. pp. 248-256.
<http://www.bioline.org.br/abstract?id=cj08024&lang=es>
20080211
35. **COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA ANÁLISIS DE DATOS BINOMIALES EN PRODUCCIÓN ANIMAL.**
http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/ZootecniaTropical/zt1801/texto/comparacion.htm
20071125

36. **DETERMINACIÓN DE LOS COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDAD *in vivo* DE LAS HARINAS DE BATATA Y DE YUCA Y DEL SORGO EN CERDOS.**
http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/ZootecniaTropical/zt0902/txto/determinacion.htm
20090820
37. **ESTIMACIÓN DEL CONSUMO DE MATERIA SECA EN VACAS HOLSTEIN BAJO PASTOREO EN EL TRÓPICO ALTO DE ANTIOQUIA**
<http://www.lrrd.org/lrrd21/4/corr21059.htm>
20060622
38. **EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE UN NUEVO INDICADOR EXTERNO (LIPE) EN LA ESTIMACIÓN DE LA PRODUCCIÓN FECAL DE BÚFALAS DE RÍO (*Bubalus bubalis*).** 2008
<http://revistas.mes.edu.cu/cjas/repositorio/00347485/tomo-42-2008/numero-04/es.pdf>
20080912
39. **J LY C. AND POK S.** 2002. Studies on the use of acid insoluble ash as inert marker in digestibility trials with Mong Cai pigs.
http://www.aida-itea.org/jornada38/nutricion/posters/p-13_jimenez-moreno.pdf
20020521
40. **JVAN KEULEN AND YOUNG B.** 1977. Evaluation of Acid-Insoluble Ash as a Natural Marker in Ruminant Digestibility Studies. Canadá: Journal Animal Science. University of Alberta. pp. 278-340
41. **LA DIGESTIBILIDAD COMO CRITERIO DE EVALUACIÓN DE ALIMENTOS, SU APLICACIÓN EN PECES Y EN LA**

CONSERVACIÓN DEL MEDIO AMBIENTE

<http://www.fao.org/docrep/field/003/AB482S/AB482S08.htm>

20070417

42. **LACHMANN M. Y ARAUJO FEBRES O.** La estimación de la digestibilidad en ensayos con rumiantes. Venezuela.
<http://books.google.com.ec/books?id=OaaETYMIcpwC&pg=PA203&lpg=PA203&dq=digestibilidad+de+alimentos&source>
20050402
43. **MCCARTHY J. y OTTROS.** 1974. El uso de HCl en ceniza insoluble como un material indicador para determinar digestibilidad con cerdos. Canada: J. Animal. Science. pp. 54-107.
44. **NIEVES D. y otros.** 2008. Determinación de digestibilidad fecal de nutrientes en dietas con forrajes tropicales para conejos mediante métodos directo e indirecto.
http://avpa.ula.ve/eventos/viii_encuentro_monogastricos/memorias/ponencias_69.pdf
20080616
45. **OAD** (Organismo Argentino de Acreditación). Guía para validación de métodos de ensayo.
<http://www.oaa.org.ar/evaluadores/DC-LE-05.pdf>
20030926
46. **PREDICCIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD *IN VIVO* DE LA MATERIA ORGÁNICA DE ENSILAJES DE HIERBA Y MAÍZ POR MÉTODOS DE LABORATORIO**
http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/03CAP_VI.pdf
47. **SHRIVASTAVA, V. S. and TALAPATRA K.** 1962. El uso de algunos indicadores naturales para determinar nutrición de animales. 2ª.ed. Chicago: J. Dairy Science. pp. 15-54.

48. **SHRIVASTAVA, V. S. and TALAPATRA K.** 1962. La determinación de consumo de la pastura animal. 3ª.ed. Chicago: J. Dairy Science. pp. 15-61.
49. **STAUB GERMAN R.** Validación de métodos <http://www.scribd.com/doc/18950740/Validacion-de-metodos>
20060321
50. **VAN DYNE, G. M. and LOFGREEN G. P.** 1964. La digestión comparativa de forraje del rango anual seco por ganado y oveja. Canadá: Journal of Animal Science. pp. 23-65.
51. **VOGTMANN, H., Y. PRABUCKI A. L.** 1975. Un nuevo método de determinar metabolización de energía y digestibilidad de ácidos grasos en dietas. Canadá: Brit. Poul. Science. pp. 16-89
52. **W. ASECAL S.L.** 2006. Estimación de la Incertidumbre de Medida. Madrid: Iberoamericana. pp. 1-26.

CAPÍTULO VIII

8. ANEXOS

ANEXO NO. 01. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN ALIMENTO BALANCEADO CERDOS DESARROLLO 2. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PRONACA. QUEVEDO. FEBRERO DEL 2010

PRODUCTO	N°	N°	P. Caja	P. M	P. Caja + MS	Humedad %
	Lote	Caja	(g)	(g)	(g)	
CERDOS DESARROLLO 2	3A	34	1,3838	5,0008	5,7908	11,87
CERDOS DESARROLLO 2	3A	19	1,3884	5,0002	5,8088	11,60
CERDOS DESARROLLO 2	3A	436	1,3243	5,0006	5,7395	11,71
CERDOS DESARROLLO 2	6A	222	1,3875	5,0008	5,8086	11,59
CERDOS DESARROLLO 2	6A	237	1,3610	5,0008	5,7906	11,42
CERDOS DESARROLLO 2	6A	789	1,3089	5,0004	5,7303	11,58
CERDOS DESARROLLO 2	9A	3	1,4023	5,0004	5,8213	11,63
CERDOS DESARROLLO 2	9A	164	1,3874	5,0002	5,8046	11,66
CERDOS DESARROLLO 2	9A	675	1,3657	5,0003	5,7844	11,63
CERDOS DESARROLLO 2	11A	85	1,4096	5,0003	5,8161	11,88
CERDOS DESARROLLO 2	11A	71	1,4112	5,0002	5,8187	11,85
CERDOS DESARROLLO 2	11A	678	1,4657	5,0009	5,8732	11,87
					PROMEDIO	11,69

ANEXO NO. 02. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN HECES DE CERDOS CUANDO INGIRIERON ALIMENTO BALANCEADO CERDOS DESARROLLO 2. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PROCESADORA NACIONAL DE ALIMENTOS CA. PRONACA. QUEVEDO. FEBRERO DEL 2010.

PRODUCTO	N°	N°	P. Caja	P. M	P. Caja + MS	Humedad %
	Lote	Caja	(g)	(g)	(g)	
Heces Cerdos Desarrollo 2	3A	301	1,7699	20,0339	9,4504	61,66
Heces Cerdos Desarrollo 2	3A	300	1,8022	20,022	9,3463	62,32
Heces Cerdos Desarrollo 2	3A	676	1,7834	20,0468	9,4058	61,98
Heces Cerdos Desarrollo 2	6A	602	1,7969	20,0003	8,6081	65,94
Heces Cerdos Desarrollo 2	6A	402	1,7598	20,0244	8,5063	66,31
Heces Cerdos Desarrollo 2	6A	465	1,7791	20,0347	8,5629	66,14
Heces Cerdos Desarrollo 2	9A	56	1,3696	20,0109	9,0222	61,76
Heces Cerdos Desarrollo 2	9A	34	1,3754	20,0760	8,8531	62,75
Heces Cerdos Desarrollo 2	9A	567	1,3923	20,0236	8,9482	62,27
Heces Cerdos Desarrollo 2	11A	111	1,3791	20,068	10,1435	56,33
Heces Cerdos Desarrollo 2	11A	125	1,3788	20,0648	9,3629	60,21
Heces Cerdos Desarrollo 2	11A	456	1,3356	20,0276	9,6898	58,29
					PROMEDIO	62,16

ANEXO NO. 03. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD A TRAVÉS DEL MÉTODO DE RECOLECCIÓN TOTAL DE HECES EN ALIMENTO BALANCEADO CERDOS DESARROLLO 2. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PROCESADORA NACIONAL DE ALIMENTOS CA. PRONACA. QUEVEDO. FEBRERO DEL 2010.

N° De Cerdo	Promedio Alim / Cons	Promedio Kg / Heces	% Humedad Alim CD2	% Humedad Heces con CD2	Kcal/Kg		Alimento Base Seca	Heces Base Seca	Consumo Energía	Excreción Energía	% Coeficiente Digestibilidad
					Promedio Energía Alim CD 2	Promedio Energía Heces CD 2					
3A	2,98	0,646	11,87	61,66	4535,99	4356,28	2,63	0,25	11912,21	1079,55	90,94%
3A	2,98	0,646	11,60	62,32	4437,82	4260,70	2,63	0,24	11691,24	1037,73	91,12%
3A	2,98	0,646	11,71	61,98	4486,92	4308,47	2,63	0,25	11805,73	1058,94	91,03%
6A	2,94	0,802	11,59	65,94	4530,89	4338,51	2,60	0,27	11776,65	1184,96	89,94%
6A	2,94	0,802	11,42	66,31	4441,11	4345,41	2,60	0,27	11565,49	1174,15	89,85%
6A	2,94	0,802	11,58	66,14	4486,02	4341,96	2,60	0,27	11661,75	1179,10	89,89%
9A	3,00	0,969	11,63	61,76	4447,02	4444,37	2,65	0,37	11789,89	1646,93	86,03%
9A	3,00	0,969	11,66	62,75	4442,63	4365,42	2,65	0,36	11773,91	1575,58	86,62%
9A	3,00	0,969	11,63	62,27	4444,83	4404,89	2,65	0,37	11783,53	1610,66	86,33%
11A	2,98	0,628	11,88	56,33	4554,23	4258,64	2,63	0,27	11959,93	1168,01	90,23%
11A	2,98	0,628	11,85	60,21	4533,17	4365,62	2,63	0,25	11907,56	1090,93	90,84%
11A	2,98	0,628	11,87	58,29	4543,72	4312,14	2,63	0,26	11933,62	1129,61	90,53%
										Promedio	89,45%

ANEXO NO. 04. FICHA TÉCNICA DE PRODUCTO TERMINADO CERDOS DESARROLLO 2. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PROCESADORA NACIONAL DE ALIMENTOS CA. PRONACA. QUEVEDO. T322RIBA

**ANEXO.05. MÉTODO DE ANÁLISIS DETERMINACIÓN DE HUMEDAD POR SECADO.
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD.
PROCESADORA NACIONAL DE ALIMENTOS CA. PRONACA. QUEVEDO. NA-AC15-M01**

Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:
K. Lara	G. Nava, Gerente de Nutrición O. Andino, Jefe de Sistemas de Calidad	J, Ibarra, Responsable del Sistema de calidad

Copia Número	
---------------------	--

1. FUNDAMENTO

- 1.1 Este método determina la pérdida de peso expresada como porcentaje de humedad de una muestra sometida al calor.

2. ALCANCE

- 2.1 Este método es aplicable a productos sólidos y semisólidos con excepción de aquellos que sometidos a temperaturas de 100 °C o mayores se descomponen.

3. DEFINICIONES

- 3.1 *Pérdida por secado.* Corresponde en su mayoría al contenido de agua libre de los productos y a pequeñas cantidades de otros compuestos volátiles.

4. MATERIALES Y EQUIPOS

- 4.1 Plato de aluminio
4.2 Desecador provisto de sustancia desecante
4.3 Balanza analítica con precisión de 0.1 mg
4.4 Estufa termoregular

5. REACTIVOS

- 5.1 No Aplica.

6. PROCEDIMIENTO

6.1 Método 1. Temperatura 104 °C, tiempo de secado 3 horas

- 6.1.1 Regular la estufa a 104 ± 2 °C
6.1.2 Colocar 3 gramos, exactamente pesados de muestra finamente molida y homogeneizada, en un plato de aluminio previamente tarado y pesado.
6.1.3 Colocar el plato en la estufa durante 3 horas (hasta peso constante).
6.1.4 Sacar el plato y enfriar en un desecador hasta temperatura ambiente.

6.1.5 Pesar y calcular la pérdida de peso y reportar como porcentaje de humedad.

6.2 Método 2. Temperatura 135 °C, tiempo de secado 2 horas

6.2.1 Regular la estufa a 135 ± 2 °C.

6.2.2 Proceder de igual manera que en método 1, con la excepción que el tiempo de secado es de 2 horas.

7. CALCULOS

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{(P_i - P_f)}{P_i} \times 100$$

En donde :

P_i peso inicial en g. antes del calentamiento
= peso del recipiente más la muestra – peso del recipiente

P_f peso final en g. después del calentamiento
= peso del recipiente más la muestra seca – peso del recipiente

8. REFERENCIA DEL METODO

8.1 *Método 1.* Método AOAC 935.29 modificado

8.2 *Método 2.* Método AOAC 930.15 modificado

9. NOTAS COMPLEMENTARIAS

9.1 Mantener la temperatura de la estufa constante el tiempo de secado de las muestras, no abrir la estufa.

9.2 La sustancia desecante debe estar en buenas condiciones, si se utiliza con indicador de humedad ésta debe estar siempre azul.

9.3 Cuando se determina el contenido de humedad en una muestra por el método 2, no se debe utilizar ésta misma muestra en la determinación de grasa cruda.

10. APENDICES

10.1 Histórico de las revisiones

Emisión No.	Fecha	Descripción
1	2010-04-13	Original

10.2 Bibliografía

10.2.1 Association of Official Analytical chemists. Official Methods of Analysis of AOAC international, 16 th Edition, Arlington USA. 1995, Volumen II, capítulo 27, p 23, Volumen I, capítulo 4, p 2.

**ANEXO. 06. MÉTODO DE ANÁLISIS DETERMINACIÓN ENERGÍA BRUTA.
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD.
PROCESADORA NACIONAL DE ALIMENTOS CA. PRONACA. QUEVEDO. NA-AC15-M36**

Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:
E. Macías, Laboratorista	O. Andino, Gerente de Aseguramiento de Calidad	J. Ibarra , Responsable del Sistema de Calidad

Copia número:	
----------------------	--

1. FUNDAMENTO

- 1.1 Este método sirve para determinar la energía bruta de una muestra sometida a ignición expresado en Kilocalorías / kilogramos.

2. ALCANCE

- 2.1 Este método es aplicable directamente a materias primas sólidas, semisólidas, aceites, productos terminados, heces secas y aquellos productos con altos contenidos de humedad deben ser previamente secados.

3. DEFINICIONES

- 3.1 *Energía Bruta.*
3.2 *Calorímetro.*

4. MATERIALES Y EQUIPOS

- 4.1 Calorímetro
4.2 Bomba calorimétrica
4.3 Calentador de agua para el calorímetro
4.4 Prensa para pastillado
4.5 Tanque de oxígeno
4.6 Balanza analítica con precisión de 0.1 mg
4.7 Cápsulas de aluminio
4.8 Pinzas
4.9 Bureta
4.10 Soporte universal
4.11 Tijeras
4.12 Regla

5. REACTIVOS

- 5.1 Solución de Carbonato de sodio 0.072N. Pesar 3.84 g de Na_2CO_3 previamente deshidratado a 100°C por 2 horas y disolver en un litro de agua recientemente hervida y fría.
- 5.2 Solución indicadora de naranja de metilo, al 0.1. Pesar 0.1g del indicador naranja de metilo, colocar en un balón de 100 ml y disolver con alcohol etílico.
- 5.3 Ácido Benzoico RA, estándar para calorimetría: pastillas de ácido benzoico grado pa.
- 5.4 Alambre de fusión de cromo níquel

6. PROCEDIMIENTO

- 6.1 Moler la muestra en un molino con criba de 1mm.
- 6.2 Preparar una pastilla en la prensa con una cantidad de muestra alrededor de 1 a 1.5 g.
- 6.3 Pesar la pastilla preparada en la cápsula de aluminio, manejar siempre la cápsula con pinzas, nunca con las manos.
- 6.4 Cortar máximo 14 cm del alambre de fusión y sujetarlos en los dos extremos del soporte de la tapa de la bomba calorimétrica doblándolos en forma de V para que tengan contacto con la muestra.
- 6.5 Colocar la cápsula con la muestra en el soporte situado en la tapa de la bomba calorimétrica y ubicar el alambre de tal forma que haga contacto.
- 6.6 Añadir 1 mL de agua dentro de la bomba calorimétrica, y cerrar la bomba teniendo cuidado de enroscar la tapa de una forma correcta.
- 6.7 Revisar que la válvula que se utiliza para desfogar la presión esté cerrado y proceder a inyectar de 25 a 35 atmósferas de oxígeno.
- 6.8 Situar la bomba dentro de la cubeta que contendrá exactamente 2 litros de agua destilada.
- 6.9 Conectar los electrodos en la bomba calorimétrica indistintamente.
- 6.10 Tapar el calorímetro y conectar el empaque del agitador hacia el motor que permite el movimiento del mismo. Encender el aparato para que trabajen los agitadores. Medir la temperatura del baño de la cubeta que contiene la bomba la cual no debe sobrepasar los 20°C si esto ocurriera, se debe cambiar el agua del baño por una más fría. Registrar la temperatura de la cubeta (Ti) cuando se estabilice o no haya variación de $\pm 0.01^\circ\text{C}$.
- 6.11 Presionar el botón rojo de ignición. La combustión de la muestra provocara un aumento en la temperatura del agua de la cubeta que contiene la bomba, aproximadamente 20 segundos después de la ignición. El incremento en la temperatura será rápido al principio y más lento a medida que se empieza a

estabilizar. Después de que la temperatura de la cubeta se ha estabilizado alrededor de 5 min., lea y registre la temperatura final (Tf).

- 6.12 Desconectar el empaque del agitador y abrir la tapa del calorímetro, desconectar los electrodos.
- 6.13 Coger la bomba calorimétrica con guantes y colocarla dentro de un chorro de agua fría para bajar la temperatura de la misma.
- 6.14 Girar la válvula para sacar la presión de oxígeno contenida en la bomba, cuando se haya liberado la presión desenrosque la tapa de la bomba y abra cuidadosamente.
- 6.15 Lave dentro de la bomba, con un chorro de agua destilada de aproximadamente 150 mL, el interior de la bomba y la cápsula que contiene la muestra, recoger en un vaso de precipitación de 250mL los líquidos del lavado y agregar 4 gotas de indicador de naranja de metilo y titule con la solución de carbonato de sodio 0.0720N hasta viraje a color amarillo. Registre los ml consumidos en la titulación.
- 6.16 Medir el alambre de fusión que no se quemó y que debe estar aún unido a los electrodos de la cápsula de la muestra, registre los centímetros del alambre residual.

7. CALCULOS

$$7.1 \quad EB \text{ (Kcal/Kg)} = \frac{(w * \Delta t) - (e_1 + e_2)}{m}$$

en donde:

EB (cal/g.)	Energía bruta expresada en calorías/gramo
w	Valor estándar de energía en calorías/°C del ácido benzoico patrón
Δt	Diferencia Temperatura final – Temperatura inicial
e_1	resultado de multiplicar el consumo de alambre en mm por el calor de combustión del alambre de fusión 0.23 cal/mm, si se usa el alambre de cromo níquel
e_2	Mililitros de carbonato de sodio 0.072N
m	Peso de la muestra en gramos

8. REFERENCIAS DEL METODO

- 8.1 Método Oficial de ASTM 1974. Standards for bomb calorimetry and combustion métodos. American Society for Testing Materials. Philadelphia. Pa, U.S.A.

9. NOTAS COMPLEMENTARIAS

- 9.1 Las muestras semisólidas y líquidas deben ser previamente secadas a una temperatura entre 60 y 80°C para evitar que el producto salpique durante la ignición por el contenido de agua.
- 9.2 Corrección por azufre. Si el contenido de azufre de la muestra es superior a 0.1% hay que determinarlo gravimétrica, volumétrica o nefelométricamente, este contenido se debe restar en el numerador de la fórmula explicada en cálculos.
- 9.3 Tener en cuenta el contenido calórico del alambre dependiendo del material que se utilice.
- 9.4 El agua del baño debe ser cambiada cada vez que se realice un nuevo análisis.
- 9.5 Cuando se manipule el tanque de oxígeno, las manos deben estar limpias, libres de grasa para evitar combustión del oxígeno, trabajar con guantes.
- 9.6 El valor estándar de energía en cal/°C del ácido benzoico patrón debe determinarse al menos una vez por año, está alrededor de 2343.82 cal/g

10. APENDICES

Histórico de las revisiones

Emisión No.	Fecha	Descripción
1	2006-03-25	Original

**ANEXO. 07. MÉTODO DE ANÁLISIS DETERMINACIÓN CENIZAS ÁCIDO INSOLUBLES.
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD. PROCESADORA
NACIONAL DE ALIMENTOS CA. PRONACA. QUEVEDO. NA-AC15-M50**

Elaborado por: J. Buñay	Revisado por: G. Nava, Gerente de Nutrición O. Andino, Jefe de Sistemas de Calidad	Aprobado por: J, Ibarra, Responsable del Sistema de calidad
--------------------------------	--	--

Copia Número	
---------------------	--

1. FUNDAMENTO

- 1.2 Este método permite determinar el contenido en materias minerales insolubles en ácido clorhídrico de los piensos y sus materias primas.

2. ALCANCE

- 2.1 Este método es aplicable directamente a materias primas orgánicas sólidas, semisólidas, a la mayor parte de los piensos compuestos, a y mezclas minerales.

3. DEFINICIONES

- 3.2 *Cenizas insolubles:* Son las cenizas (es decir los restos inorgánicos de una combustión) que no son solubles en medio ácido.

- 3.3 *Pienso:* Alimento terminado

4. MATERIALES Y EQUIPOS

- 4.1. Capsulas de aluminio
4.2. Crisoles de porcelana
4.3. Erlenmeyer 250 mL

- 4.4. Papel Filtro cuantitativo libre de cenizas
- 4.5. Percolador
- 4.6. Piceta
- 4.7. Balanza analítica con precisión de 0.1 mg
- 4.8. Bomba de vacío
- 4.9. Desecador provisto de sustancia desecante
- 4.10. Estufa termo regulable
- 4.11. Mufla termo regulable
- 4.12. Plancha de calentamiento

5. REACTIVOS

- 5.1. Ácido Clorhídrico 4 N
- 5.2. Agua Destilada
- 5.3. Nitrato de Plata 0.1 N

6. PROCEDIMIENTO

- 6.2 Se toma un peso de 10 g en la Balanza Analítica con sensibilidad 0,1 mg de muestra seca deshidratada en la estufa termo regulable y enfriada en el Desecador, de alimento balanceado y heces fecales
- 6.3 Se coloca la muestra dentro del erlenmeyer de 250 mL, y se agrega 100 mL de Ácido Clorhídrico (HCl) 4 N.
- 6.4 La mezcla es hervida muy despacio por un período de 30 minutos en una plancha de calentamiento, junto con un extractor de vapor de aire
- 6.5 La mezcla caliente se filtra, utilizando papel filtro cuantitativo libre de cenizas.
- 6.6 Mientras se realiza la filtración se lava el filtrado con agua destilada caliente (85 a 100 °C), eliminando el Ácido Clorhídrico de la muestra.
- 6.7 Se verifica que se haya eliminado por completo el Ácido Clorhídrico, tomando la solución de lavado y añadiéndole 10 mL de Nitrato de Plata 0.1 N, hasta que no exista la formación de un precipitado blanquecino.
- 6.8 La ceniza junto con el papel filtro se transfieren a un crisol de 50 mL previamente pesado.

- 6.9 Se introduce dentro de la mufle termo regulable durante 12 horas a 650 °C
- 6.10 El crisol junto con la ceniza se refresca en un desecador para regular la temperatura y se pesa

7. CALCULOS

$$\text{Cenizas Insolubles \u00c1cido (\%)} = \frac{(P_f - P_c)}{P_m} \times 100$$

En donde:

- P_m = peso de la muestra seca
- P_f = peso de la capsula m\u00e1s la ceniza insoluble en \u00e1cido
- P_c = peso de la capsula vac\u00eda.

8. REFERENCIA DEL METODO

8.1. M\u00e9todo CIA cenizas insolubles en \u00e1cido seg\u00fan el Autor **Vogtmann-1975, utilizando HCl 4N**. Documento: Evaluation of Acid-Insoluble Ash as a Natural Marker in Ruminant Digestibility Studies. Journal Animal Science. University of Alberta. Canada

9. NOTAS COMPLEMENTARIAS

- 9.4 Mantener la temperatura de la estufa constante el tiempo de secado de las muestras, no abrir la estufa.
- 9.5 Se debe evitar dejar enfriar la mezcla de la muestra tratada con \u00e1cido para que pueda eliminarse todo el \u00e1cido cuando se realiza el lavado.

10. APENDICES

